

Studien zur Synthese von steroidrezeptor-bindenden Phototherapeutika

Dissertation

zu Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe Universität
in Frankfurt am Main

von
Christian Michael Orth
aus Trier

Frankfurt am Main 2003

(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavecz

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Dingermann

Datum der Disputation: 24.02.2004

Meinem verstorbenem Vater gewidmet

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 1998 bis Mai 2001 am Institut für pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt.

Für die Überlassung des Themas sowie Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die Diskussion der Ergebnisse möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavecz ganz herzlich danken.

Dem Graduierten-Kolleg 137/2 „Entwicklung und Analytik von Arzneistoffen“ danke ich für die finanzielle Unterstützung und für die Möglichkeiten zur Teilnahme an Kongressen und Seminaren.

Herrn Dipl. Chem. W. Strauß, Herrn Dipl. Chem. H. Emmert und Herrn Dipl. Biol. R. Sailer am Institut für Lasertechnologie in der Medizin und Meßtechnik (ILM) an der Universität Ulm danke ich für ihre Ratschläge und Tipps, sowie für die Bereitstellung von Materialien.

Bei Herrn Dipl. Ing. (FH) St. Bihler bedanke ich mich für die Aufnahme von NMR-Spektren und die Einweisung in die NMR-Messungen.

Frau A. Wilke gilt mein Dank für die Aufnahme einiger Massenspektren und Elementaranalysen.

Mein Dank gilt auch meiner Laborkollegin Frau Dipl. Chem. D. Oehler für die gute Zusammenarbeit sowie Herrn Dipl. Chem. St. Gebhardt, Herrn Dr. M. Wurglics, Frau Dr. A. Kaunzinger, Frau Apothekerin M. Tawab, Frau Apothekerin A. Altmann und Frau Apothekerin K. Westerhoff für die freundliche Atmosphäre im Arbeitskreis.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen anderen Personen, die zur der Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	2
2.1 GESCHICHTE DER PHOTODYNAMISCHE THERAPIE.....	2
2.2 PHOTSENSIBILISATOREN	2
2.2.1 <i>Hydrophobe Photosensibilisatoren.....</i>	<i>5</i>
2.2.2 <i>Hydrophile Photosensibilisatoren</i>	<i>7</i>
2.2.3 <i>Amphotere Photosensibilisatoren.....</i>	<i>9</i>
2.3 PHOTO- UND RADIKALCHEMIE	14
2.3.1 <i>Radikalentstehung.....</i>	<i>15</i>
2.3.2 <i>Singlett Sauerstoff als cytotoxisches Reagenz.....</i>	<i>16</i>
2.4 WIRKMECHANISMEN DER PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE	16
2.4.1 <i>Zelluläre Effekte.....</i>	<i>17</i>
2.4.2 <i>Vaskuläre Effekte</i>	<i>18</i>
2.5 DRUG TARGETING IN DER PDT	19
2.5.1 <i>Liposomen.....</i>	<i>19</i>
2.5.2 <i>Serumproteine.....</i>	<i>20</i>
2.5.3 <i>Monoklonale Antikörper.....</i>	<i>20</i>
2.5.4 <i>Nukleäre Rezeptoren.....</i>	<i>21</i>
2.5.5 <i>Rezeptorliganden</i>	<i>22</i>
2.6 DER PROGESTERON - REZEPTOR.....	25
2.6.1 <i>Aufbau des Progesteron - Rezeptors</i>	<i>25</i>
2.6.2 <i>Progesteron - Antagonisten.....</i>	<i>26</i>
2.6.3 <i>Progesteron relevante Krebsarten.....</i>	<i>29</i>
2.7 ANWENDUNGEN DER PDT	30
2.7.1 <i>Bronchialkarzinome.....</i>	<i>30</i>
2.7.2 <i>Altersbedingte Makuladegeneration</i>	<i>31</i>
2.7.4 <i>Gastrointestinal-Trakt</i>	<i>32</i>
2.7.5 <i>Dermatologie</i>	<i>32</i>
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	35
3.1 SYNTHESE DER BENZYLALKOHOLE	39
3.2. EINFÜHRUNG DES SPACERS	42

3.4 AUFBAU DES CYCLOCYMOPOLDERIVAT	46
3.5 CARBONYLOLEFINIERUNG	49
4. ZUSAMMENFASSUNG	57
4.1 SUMMARY	59
5. AUSBLICK.....	60
6. EXPERIMENTELLER TEIL.....	61
<i>6.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....</i>	<i>61</i>
<i>6.1.2 Chromatographie.....</i>	<i>61</i>
<i>6.1.3 Kernresonanzspektroskopie</i>	<i>61</i>
<i>6.1.4 Massenspektrometrie</i>	<i>61</i>
6.2 SYNTHESEN.....	62
7. LITERATURVERZEICHNIS	111
8. LEBENSLAUF	115

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AIBN	Azoisobutyronitril
ALA	5-Aminolävulinsäure
BSA	Bovines-Serum-Albumin
DCM	Dichlormethan
DMAP	4-N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EGF	Epidermis-Wachstum-Factor
EGFR	Epidermis-Wachstum-Factor-Rezeptor
EWG	elektronenziehende Gruppe
H	n-Hexan
HPD	Hämatoporphyrinderivat
LDA	Lithium-diisopropylamin
LDL	Lipoprotein geringer Dichte
KDa	Kilodalton
na	nicht nachweisbar
NBS	N-Bromsuccinimid
NC	Naphthalocyanine
NLS	nuclear localisation sequence
NPC	Kern-Poren-Komplex
PC	Phthalocyanine
PDT	Photodynamische Therapie
Pp	Protoporphyrin
PS	Photosensibilisator
PVA	Polyvinylalkohol
RT	Raumtemperatur
THF	Tetrahydrofuran

1. Einleitung

Die Erfolge in der modernen Medizin ermöglichen es heute viele Krankheiten zu heilen. Dennoch haben einige Krankheiten ihren Schrecken noch nicht verloren. An erster Stelle sind hier die Krebserkrankungen zu nennen. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts erkrankten 1999 in Deutschland 338.300 Menschen neu an Krebs. Hierbei handelt es sich nicht um ein festes Krankheitsbild, sondern um einen Überbegriff für etwa 100 verschiedene Formen, mit zum Teil zahlreichen Subtypen.

Zur Behandlung von malignen Tumoren werden neben der chirurgischen Entfernung und Strahlenbehandlung auch Cytostatika, allgemein Chemotherapeutika genannt, eingesetzt. Unter günstigen Umständen erzielen die Chemotherapeutika eine hohe Heilungsrate, wenn sie auch für den Patienten unangenehme Nebenwirkungen wie Alopezie und Nausea hervorruft.

Eine relativ neue Form des chemotherapeutischen Ansatzes zur Behandlung von Neoplasien stellt die photodynamische Therapie (PDT) dar. Diese Methode besitzt bei einige Indikationen, beispielsweise dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, die Vorteile sowohl eine hohe Heilungsrate als auch eine geringe Nebenwirkungsrate in sich zu vereinen. Bei vielen potentiellen Indikationen befindet sich die Photodynamische Therapie jedoch noch in einem experimentellen Stadium.

Nach der intravenösen Applikation des Wirkstoffes, wird nach 24 bis 48 h eine systemische Verteilung des Phototherapeutikums festgestellt. Diese systemische Verteilung zwingt die Patienten jedoch nach der Behandlung einige Woche in abgedunkelten Räumen zu verbringen.

Um dies zu vermeiden, werden mehrere Ansätze erforscht, die Tumorselektivität der PDT zu steigern. Im Allgemeinen wird der Wirkstoff an ein tumorspezifisches Agens wie einen monoklonalen Antikörper oder an einen Liganden eines Rezeptortyps, welche die Tumorzelle überexprimieren, gebunden. Die Forscher setzen für das Drug Targeting so unterschiedliche Rezeptorliganden wie beispielsweise Insulin oder Östrogen ein.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Selektivität der PDT durch Verknüpfen von PDT-Farbstoffen an Progesteronantagonisten zu verbessern.

2. Theoretische Grundlagen

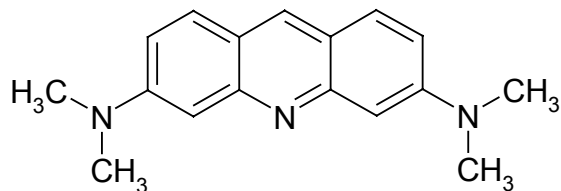
2.1 Geschichte der Photodynamische Therapie

Schon früh erkannten die Menschen die heilende Wirkung des Lichtes. Bereits im Altertum nutzten die Griechen Pflanzenextrakte in Kombination mit Licht, um z. B. die Schuppenflechte oder Vitiligo zu behandeln.

Im Jahre 1900 wurde von *Oscar Raab* die Abtötung des Bakteriums *Paramecium caudatum* durch Licht bei gleichzeitiger Anwesenheit des Farbstoffes Acridin Orange beschrieben [1]. Wenig später referierten *von Tappeiner* und *Jesionek* erstmals über die Behandlung von Hauttumoren und *Lupus vulgaris* durch Auftragen des Farbstoffes Eosin auf die betroffenen Hautpartien und anschließende Bestrahlung mit Licht [2]. 1904 führte *von Tappeiner* den Begriff „photodynamisch“ ein, um eine chemische Reaktion in biologischen Systemen zu beschreiben, die auf Photosensibilisierung beruht [3]. Unabhängig von dieser Arbeit wiesen *Policard* sowie *Auler* und *Banzer* eine spezifische Anreicherung von Porphyrinen in Tumoren nach [4, 5]. Diese Pionierarbeiten wurden 1978 von *Dougherty* wieder in den Blickpunkt der wissenschaftlichen Tumorforschung gerückt, als es ihm und seinen Mitarbeitern gelang, Hautkrebs mit Porphyrinen und Licht zu bekämpfen [6].

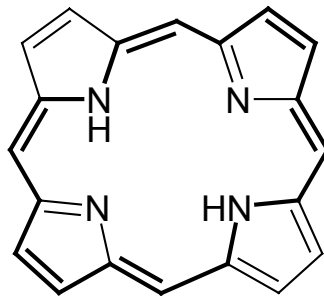
2.2 Photosensibilisatoren

Oscar Raab benutzte in seinen Versuchen einfache Farbstoffe wie Acridin Orange **1** [1].



1

In der heutigen Medizin werden spezielle Sensibilisatoren verwendet, denen das Porphin-Grundgerüst **2** mit 18 π -Elektronen gemeinsam ist.



2

An den Einsatz moderner Photosensibilisatoren in klinischen Studien oder gar in der klinischen Praxis sind einige Bedingungen geknüpft [7]. Photofrin[®], das erste zugelassene Phototherapeutikum, ist ein nicht definiertes Gemisch von Porphyrin-Oligomeren. Für den klinischen Einsatz wäre jedoch ein definierter Wirkstoff von Vorteil. Der Wirkstoff sollte eine möglichst große Absorption im Wellenlängenbereich von 600 bis 800 nm besitzen. Diese Eigenschaft kann durch eine große Anzahl konjugierter π -Bindungen entlang des Makrozyklus erreicht werden. Des Weiteren sollten Photosensibilisatoren im wässrigen Medium nicht zur Aggregation neigen, was sich durch ionische Seitengruppen verhindern lässt. Zu den geforderten photophysikalischen Eigenschaften gehört ein stabiler Triplett-Zustand und eine hohe Ausbeute an Singlett-Sauerstoff. Zusätzlich sollte sich der Wirkstoff nur geringfügig im gesunden Gewebe, insbesondere der Haut, anreichern und keine mutagenen Eigenschaften besitzen.

Neben der kaum ausgeprägten Tumorspezifität der Phototherapeutika, sind vor allem ihr Absorptionsvermögen im roten Bereich (650-800 nm) des sichtbaren Lichtes bedeutsam. Im menschlichen Gewebe kann Licht nur kurze Strecken durchlaufen, bevor es absorbiert oder gestreut wird. Die Transmission steigt mit der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes (*Abb. 1*).

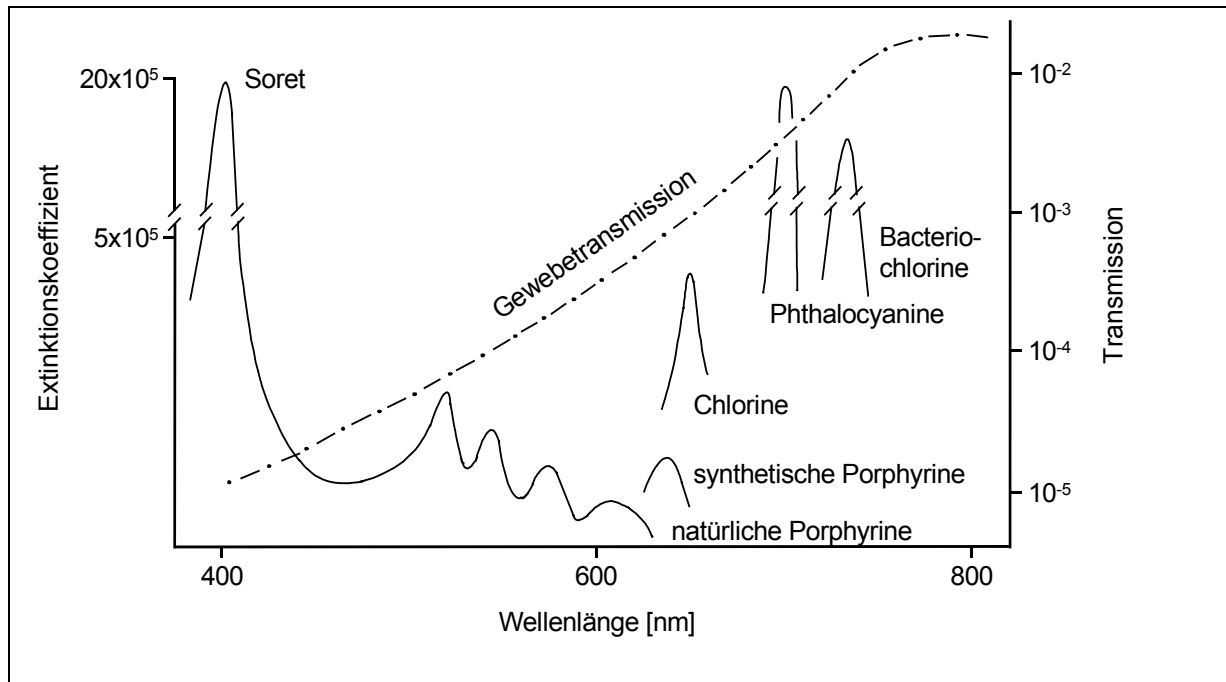


Abb. 1: Gewebetranmission von Licht nach [8]

Im IR-Bereich erfolgt wieder ein Anstieg der Absorption, weshalb ein Photosensibilisator Idealerweise ein Absorptionsmaximum von 750 - 800 nm besitzen sollte.

In den Anfangsjahren wurden Porphin-Systeme eingesetzt, die man durch Extraktion aus biologischen Materialien gewann. Diese Vorgehensweise wurde aufgrund der strukturellen Verwandtschaft des Porphyrins mit zwei bedeutenden natürlichen Farbstoffen gewählt: dem pflanzlichen Chlorophyll und dem Hämoglobin beim Mensch bzw. Tier. Diese natürlichen Porphin-Derivate besitzen jedoch nur eine geringe Absorption in dem oben genannten Bereich. Die Forschung konzentrierte sich zunächst auf die Synthese verschiedener Derivate mit verbesserter Absorption im roten Bereich.

Die modernen Photosensibilisatoren lassen sich grob in drei Klassen unterteilen: hydrophobe, hydrophile und amphotere Sensibilisatoren [9].

Hydrophobe Farbstoffmoleküle besitzen keine ionischen Seitengruppen und keine Löslichkeit in Wasser oder Alkohol. Hydrophile Phototherapeutika besitzen mindestens drei ionische Gruppen und sind in Wasser bei physiologischem pH-Wert gut löslich. Amphotere Photosensibilisatoren haben einen oder zwei geladene Substituenten und sind in Wasser und / oder Alkohol löslich.

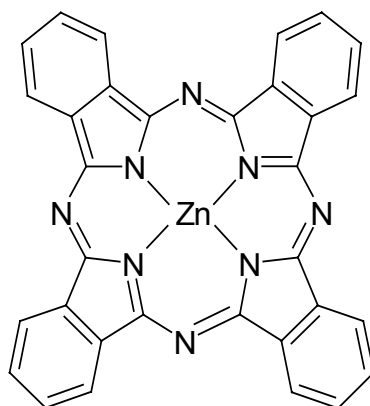
Die Unterscheidung erfolgt nicht nur aufgrund der Löslichkeit, sondern auch aufgrund der intrazellulären Verteilung der Farbstoffe, da diese ebenfalls abhängig von

der Hydrophilie ist. Allgemein gilt, dass sich hydrophile Sensibilisatoren nicht in den Tumorzellen anreichern, sondern im Tumorstroma und vaskulären Epithelzellen. Lipophile Wirkstoffe dagegen verteilen sich diffus in den Zellen.

2.2.1 Hydrophobe Photosensibilisatoren

Die verbreitetste Art hydrophober Photosensibilisatoren sind die Phthalocyanine (Pc) und die verwandten Naphthalocyanine (Nc), welche einen Tetrabenzyl-tetraazu-porphyrin bzw. Tetranaphtho-tetraazu-porphyrin-Ring besitzen. Die verschiedenen Derivate unterscheiden sich durch die Substituenten am Benzyl- bzw. Naphthylring. Weiterhin können beide Grundgerüste Metallatome als Zentralion enthalten. Die Pc's und Nc's welche in der PDT verwendet werden, sind ohne Ausnahme metalliert.

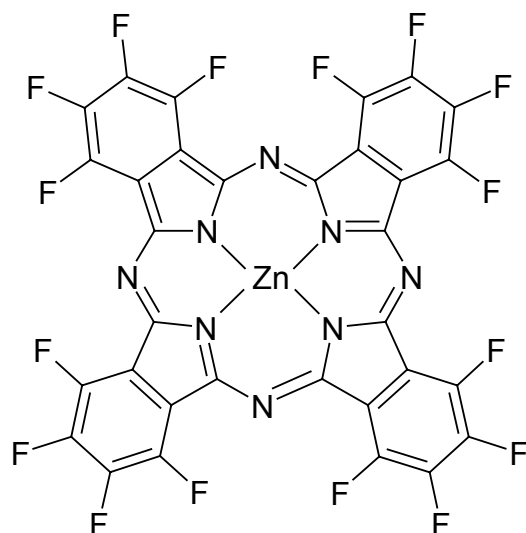
Für die einfachste Verbindung, das Zink-Phthalocyanin (ZnPc) **3**, existieren Daten zur Tumorselektivität in Tierversuchen [10].



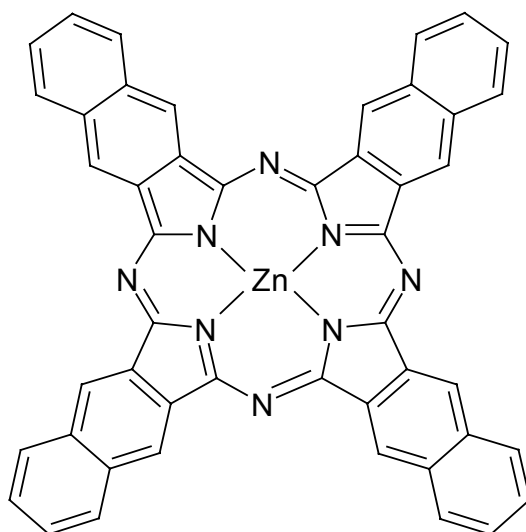
3

Nach einer interperitonealen Injektion von 0,5 mg/kg in weibliche Mäuse mit einem MS-2 Fibrosarcom wurden nach 24 Stunden eine maximale Tumorkonzentration von 0,6 µg/g nachgewiesen, bei einem gleichzeitigen Tumor-Muskel Verhältnis von 7,5.

Ein ungewöhnliches Substitutionsmuster weist das Zink-Hexadecafluorophthalocyanin **4** auf. Durch radioaktiv markiertes Zink konnte man bei Mäusen mit dem EMT-6 Tumor nach 72 h eine relative Tumor-Muskel-Gewebe Konzentration von 12:1 feststellen und für die Haut ein Verhältnis 5:1 [11].

**4**

Naphthalocyanine **5** sollten durch ihre starke Absorption im Bereich von 750 - 800 nm für die PDT sehr gut geeignet sein. Durch die im Vergleich zu den Pcs zusätzlichen 4 Benzenringe erhöhen sich die hydrophoben Eigenschaften erheblich.

**5**

Diese Lipophilie ist nach den Ergebnissen der ersten Tests nur von geringem Vorteil, sie führt lediglich zu einem Tumor-Muskel Verhältnis von 1,4 zu 1. Durch Anknüpfung von Ethergruppen an die Naphthylringe konnte das Tumor-Muskel Verhältnis geringfügig verbessert werden [12].

2.2.2 Hydrophile Photosensibilisatoren

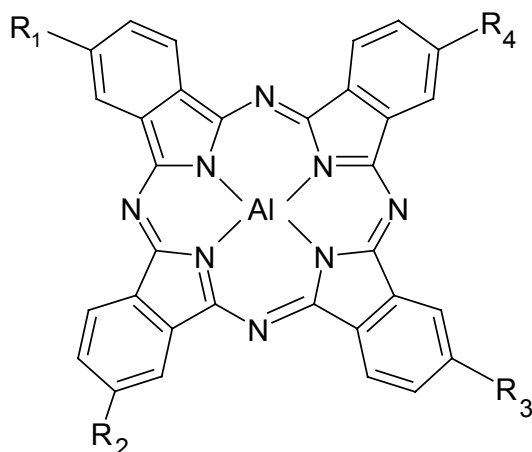
Hydrophile Photosensibilisatoren zeichnen sich durch ionische Substituenten aus, die ihnen ein gewisses Maß an Wasserlöslichkeit ermöglichen. Bei den Wirkstoffen für die PDT werden meistens anionische Gruppen in Form von Sulfon- oder Carboxylgruppen verwendet.

Die Phthalocyanine sind eine wichtige Leitstruktur dieser Art von Photosensibilisatoren, da die sulfonierten Aluminium-Pcs eine gut untersuchte Gruppe von Sensibilisatoren darstellen. Da Aluminium dreiwertig ist, durch die Komplexbildung durch Pc's nur 2 Bindungsstellen abgedeckt werden, benötigt man noch einen weiteren Liganden, meistens ein Chlorid-Ion.

Die Bioverfügbarkeit der vier unterschiedlichen Substitutionsmuster bezüglich der Sulfonierung, also tetra-, tri-, di- und mono-sulfon-Aluminium-Phthalocyaninen **6**, wurden bei Mäusen mit Colon-Tumor untersucht [13]. Den Mäusen wurde jeweils 9,1 µmol/kg Körpergewicht des Photosensibilisators intravenös injiziert.

	MUSKEL	HAUT
Mono-Al-Pc	na	na
Di-Al-Pc	10	5
Tri-Al-Pc	14	2,8
Tetra-Al-Pc	28	2

Tab. 1: Konzentrationsverhältnisse zwischen Tumor und ausgesuchten Geweben



6

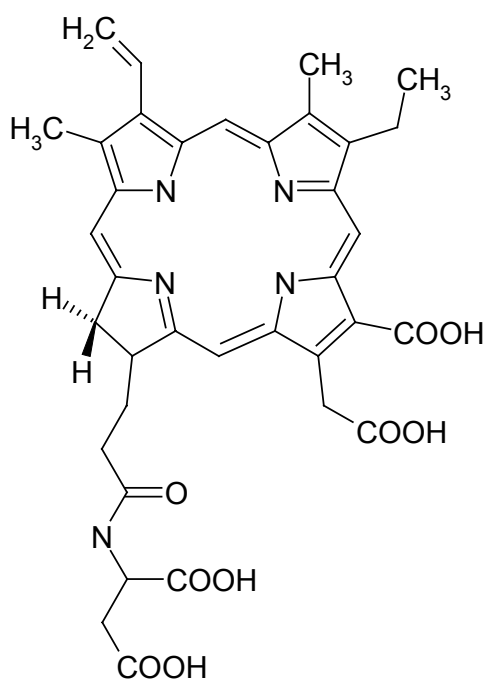
mono-AlPc: $R_1 = \text{SO}_3\text{H}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$

di-AlPc: $R_1 = R_2 = \text{SO}_3\text{H}$, $R_3 = R_4 = \text{H}$

tri-AlPc: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \text{H}$

tetra-AlPc $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{SO}_3\text{H}$

Ein weiterer Vertreter von hydrophilen Photosensibilisatoren ist das Mono-L-aspartyl-Chlorin e_6 (MACE) **7**. Bei weiblichen Mäusen, denen 5 mg/kg Körpergewicht radioaktiv markiertes ^{14}C -MACE intravenös injiziert wurde, fand man nach 8 h ein Tumor-Muskel-Verhältnis von 10,6 bzw. einen Tumor-Haut-Wert von 2,2 [14].



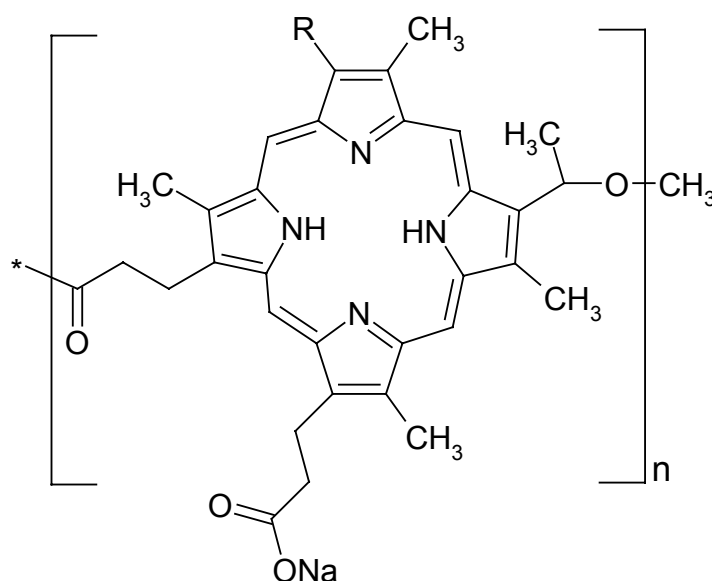
7

2.2.3 Amphotere Photosensibilisatoren

Amphotere Photosensibilisatoren zeichnen sich durch eine hydrophobe und eine hydrophile Region im Molekül aus. Dies wird durch eine asymmetrische Substitution des Porphyrinringes mit ionischen Gruppen erreicht.

Die bisher in Deutschland im Rahmen der Photodynamischen Therapie zugelassenen Wirkstoffe Photofrin[®] und Verteporfin[®] gehören zu dieser Photosensibilisatoren-Gruppe.

Bei dem Wirkstoff von Photofrin[®] **8** handelt es sich um Porfimer-Natrium. Dieser Wirkstoff ist ein Oligomerengemisch, bei dem mehrere Porphyrinringe (bis zu 8) über Ether- (zu 90%) und Esterverbindungen (zu 10%) verknüpft sind. Neben diesen Oligomeren enthält Photofrin[®] noch Hämatoporphyrin, Hydroxy-ethyl-vinyl-Deuteroporphyrin und Protoporphyrin. Die Wirkstoffe werden durch Polymerisation von Hämatoporphyrin-dihydrochlorat, hergestellt aus isoliertem Hämin von Schweineblut, gewonnen [15].



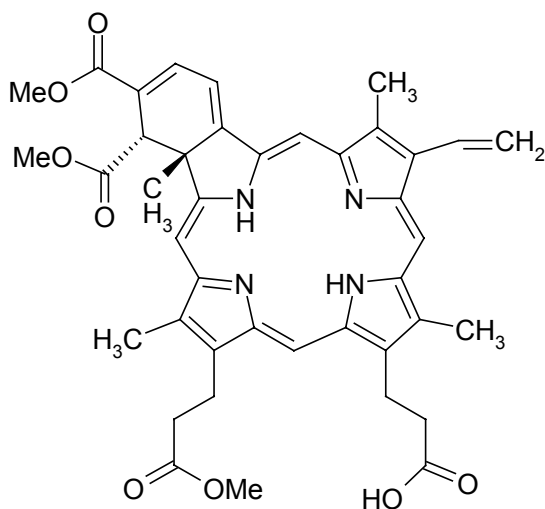
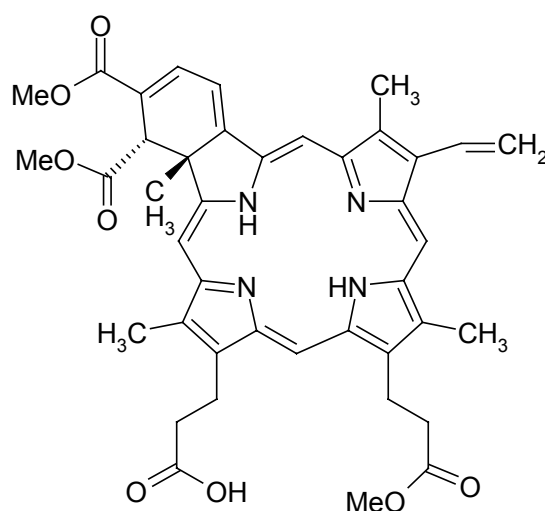
8

Die Verteilung und Elimination von ¹⁴C markiertem Photofrin[®] wurde in Mäusen bestimmt. Die Tiere erhielten intraperitoneal Injektionen von 5 bzw. 27 mg/kg Körpergewicht. Die stärkste Radioaktivität wurde in der Leber festgestellt, die schwächste im Gehirn. Die Elimination von Photofrin[®] erfolgte hauptsächlich über die Fäces, während über den Urin nur 6% ausgeschieden wurden. Das höchste Tumor-Haut-Verhältnis von 3,7 konnte nach 72 h beobachtet werden. Der entsprechende Wert für das Tumor-Muskel-Verhältnis betrug 2.

Verteporfin® **9** ist ein Mono-benzo-porphinderivat mit einem Absorptionsmaximum bei 689 nm. Der Wirkstoff ist seit dem 1. August 2000 in der EU für die altersbedingte Makulardegeneration zugelassen. Die Synthese erfolgt aus Protoporphyrin, wobei man 2 Konstitutionsisomere erhält [16].

Die therapeutische Dosis von Verteporfin im Rahmen der PDT beträgt 6 mg/m². Eine Studie deutete an, dass der Wirkstoff über den LDL-Rezeptor aufgenommen wird [17]. Die Aufnahme des Therapeutikums verbessert sich durch vorheriges Mischen mit LDL. Eine Untersuchung legte dar, dass der Wirkstoff Verteporfin innerhalb 24 h nach der Injektion komplett aus dem Blutkreislauf eliminiert wird [18].

In Phase III der klinischen Erprobung konnte bei 63% der erkrankten Augen ein Fortschreiten der Krankheit verhindert werden. 7% der Patienten zeigten sogar eine Verbesserung der Sehleistung [19].

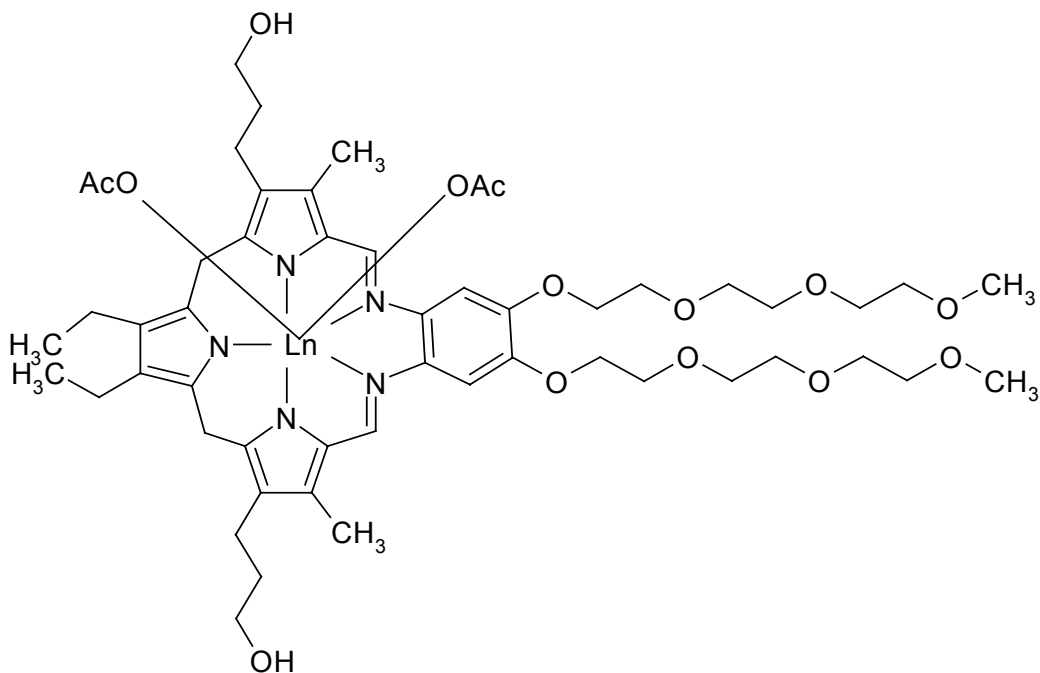
**9a****9b**

Eine weitere Gruppe von Photosensibilisatoren, für welche die Zulassung in den nächsten Jahren erwartet wird, sind die Texaphyrine **10**. Es handelt sich dabei um Pentaaza-Makrocyclen, die unter Bildung von zwei Schiff'schen Basen entstehen [20]. Durch den größeren Ring und die fünf statt vier der bei den Porphyrinen enthaltenen Stickstoffatome, können auch Kationen der Lanthanoiden-Gruppe komplexiert werden.

Beispielsweise mit Gd(III) Kationen als Zentralion, kann dieses Texaphyrin - Derivat innerhalb der Strahlungstherapie eine große Hilfe sein. Die durch die unspezifische Wirkungsweise von γ -Strahlen hervorgerufenen Nebenwirkungen können mit Hilfe von Gd(III)-Texaphyrin gemindert werden. Hierfür wurde folgender Mechanismus

vorgeschlagen: Treffen γ -Strahlen auf Wasser so entstehen Radikale und freie Elektronen, Letztere werde durch das Gd-Texaphyrin aufgenommen und stehen für die Rekombination mit den Radikalen nicht mehr zur Verfügung. Durch die Anreicherung des Wirkstoffes im Tumorgewebe entsteht dort eine wesentlich höhere Konzentration von Radikalen, welche den Tumor schädigen. Dieser Effekt ermöglicht eine Verringerung der eingesetzten γ -Strahlung.

Diese Senkung der γ -Strahlung und damit der Nebenwirkungsrate konnte in einem klinischen Test der Phase II bei 61 Patienten mit Gehirntumor bestätigt werden [21]. Die photophysikalischen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse lassen sich sehr leicht variieren. Durch den Austausch von Gd(III) mit beispielsweise Lu(III) als Zentralion, erhält man einen wasserlöslichen Photosensibilisator mit einem Absorptionsmaximum von 732 nm [22]. Dieser Sensibilisator wird in klinischen Studien angewendet, um atherosklerotische Plaques in den Blutbahnen zu entfernen.



2.2.4 Amino-Lävulinsäure

Die 5-Amino-Lävulinsäure (ALA) **11** kann in die zuvor genannte Einteilung der Photosensibilisatoren nicht eingesetzt werden [3]. Bei ALA handelt es sich nicht um einen synthetischen Sensibilisator, sondern um eine Vorstufe, die durch mehrere Syntheseschritte im Körper und Tumor zu Protoporphyrin IX (Pp IX) **12**, einem endogenen Photosensibilisator, metabolisiert wird (*Abb. 2*). Im nächsten Schritt würde das Enzym Ferrochelatase ein Fe^{2+} -Ion in das Pp IX einbauen und Häm entstehen, welches nicht als Phototherapeutikum fungieren kann. Die Synthese von Häm wird jedoch durch einen Feedback Mechanismus kontrolliert [23]. Bei einem Überschuss von Häm wird die endogene ALA Synthese gedrosselt. Durch die Applikation von ALA wird dieser Mechanismus übergangen. Im langsamsten Schritt der Häm-Synthese kommt es zur Anreicherung des Vorgängerproduktes, hier dem photoaktiven Pp IX. In den Tumorzellen verläuft diese Pp IX Synthese durchschnittlich 20 mal schneller als im gesunden Gewebe. Da dieser Reaktions-Schritt in den Mitochondrien stattfindet, sind diese bei Bestrahlung mit Licht besonders betroffen.

Trotz der Entwicklung von 5-Amino-Lävulinsäure als Cytostatikum wird sie zur Zeit jedoch hauptsächlich in der Dermatologie eingesetzt [24].

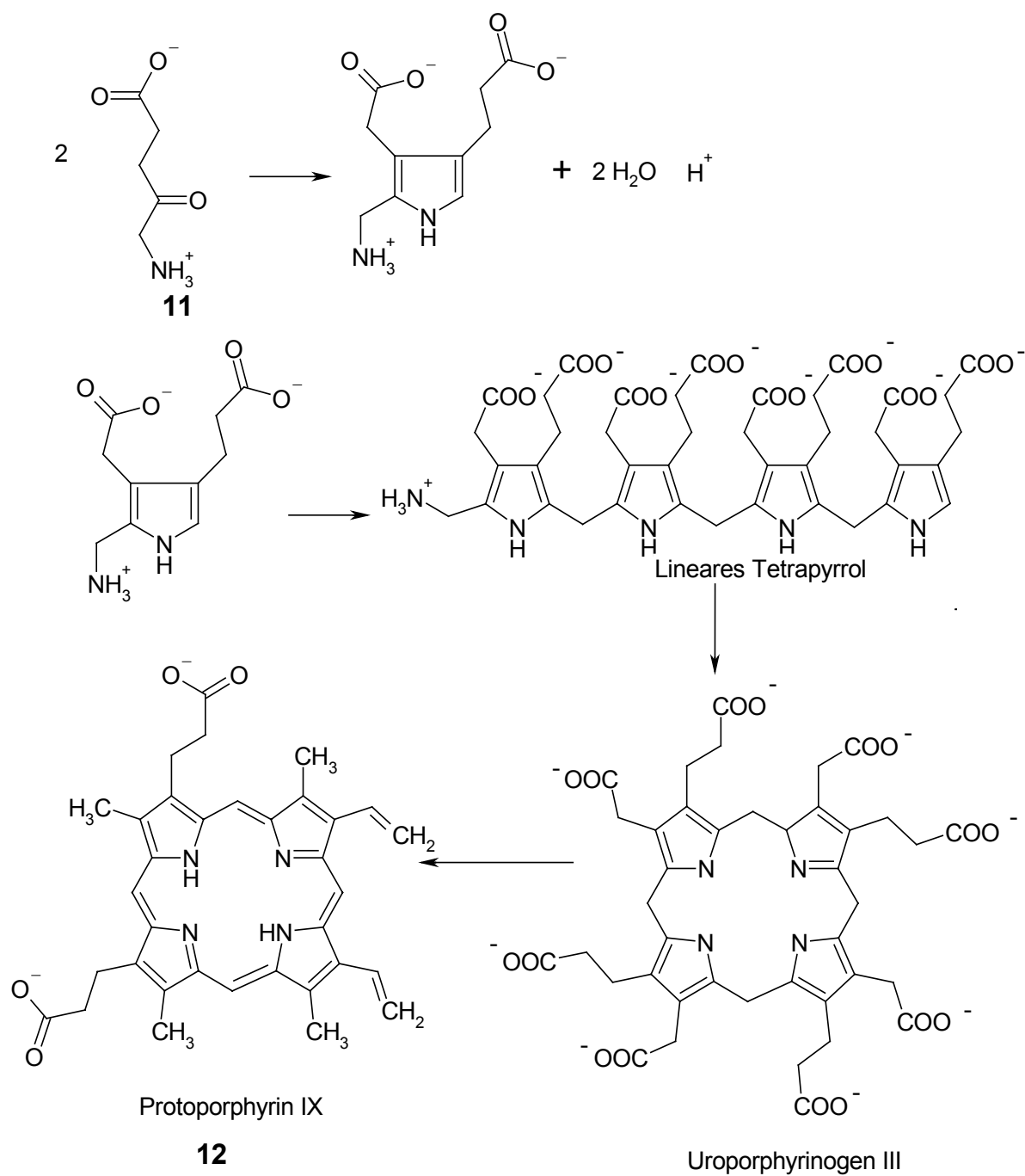


Abb.2: Synthese von Protoporphyrin IX aus Alanin nach [25]

2.3 Photo- und Radikalchemie

Damit Licht photochemisch wirksam sein kann, müssen Lichtquanten von Molekülen absorbiert werden. Durch den Absorptionsvorgang werden Elektronen angeregt und gehen in Molekülorbitale mit höherer Energie über. Nach dieser Anregung können die Moleküle, im Fall der PDT die Photosensibilisatoren, unter Abgabe von Energie wieder in den Grundzustand zurück gelangen. Für diese Energiedissipation stehen dem Sensibilisator mehrere Wege offen. Die dissipierte Energie kann Schwingungen innerhalb des Moleküls oder bei anderen Molekülen erzeugen. Eine weitere Möglichkeit Energie abzugeben, sind chemische Reaktionen mit Molekülen in der nächsten Umgebung oder die Abstrahlung von Energie in Form von Fluoreszenz (*Abb. 3*).

Im Normalfall bleibt der Spinzustand des Elektrons durch die Anregung unverändert. Das angeregte und das Elektron im Grundzustand besitzen entgegengesetzten Spin (Singlett-Zustand). Bei genügend großer Halbwertszeit des angeregten Zustands kann es auch zu einer Spinumkehr (inter-system-crossing) in den Triplett-Zustand kommen, in dem die beiden Elektronen den gleichen Spin besitzen. Dieser Zustand ist normalerweise etwas stabiler als der Singlett-Zustand, da die Wechselwirkung zwischen den Elektronen geringer ist.

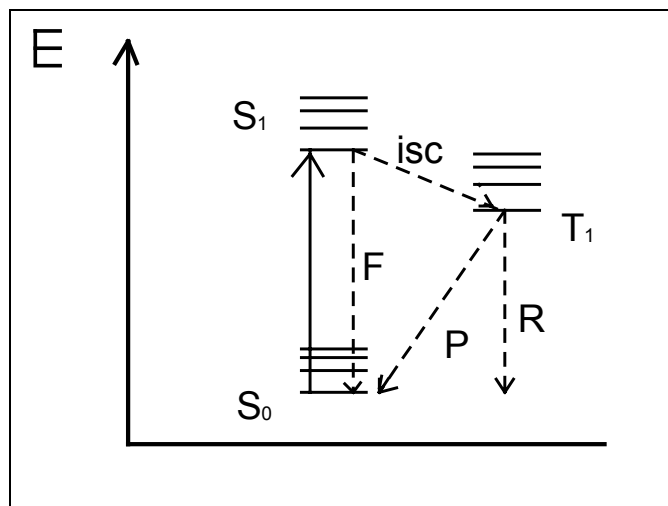


Abb.3: Jablonski-Diagramm (F = Fluoreszenz, P = Phosphoreszenz, R = Reaktion, E = Energie, isc= inter-system-crossing)

2.3.1 Radikalentstehung

Bei der Radikalerzeugung durch photochemische Prozesse handelt es sich um Elektronentransfer-Reaktionen. Bei diesen Umsetzungen wird zwischen zwei Typen von Reaktionsmechanismen unterschieden [26].

Bei Typ-I-Reaktionen reagiert der angeregte Sensibilisator direkt mit dem Substrat und/oder Lösungsmittel. Die entstandenen Radikale bilden mit dem ubiquitären Sauerstoff ein kompliziertes Gemisch aus hochreaktiven Sauerstoffverbindungen wie Superoxid-Anionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale (OH^\cdot). Diese Radikalspezies bzw. deren Reaktionsprodukte können mit Hilfe der ESR-Spektroskopie in der biologischen Matrix nachgewiesen werden.

Innerhalb der PDT herrscht allerdings die Typ-II-Reaktion vor. Der angeregte Photosensibilisator geht durch ein inter-system-crossing vom angeregten Singlett-Zustand in den Triplett-Zustand über. Der Triplett-Zustand ist mit einer Halbwertszeit von mehreren Millisekunden wesentlich stabiler als der Singlett-Zustand des Farbstoffes. Dieses inter-system-crossing ist von Bedeutung, da der molekulare Sauerstoff im Grundzustand ebenfalls im Triplett-Zustand vorliegt (Abb. 4). Dem Pauli-Gesetz folgend müssen beide Reaktionspartner im gleichen Spinzustand vorliegen, um reagieren zu können, da sonst das „Spinverbot“ gilt. Nach dem inter-system-crossing gibt der angeregte Photosensibilisator die überschüssige Energie an den Sauerstoff ab. Der Sauerstoff wechselt daraufhin vom Triplett-Zustand in den angeregten Singlett-Zustand (1O_2).

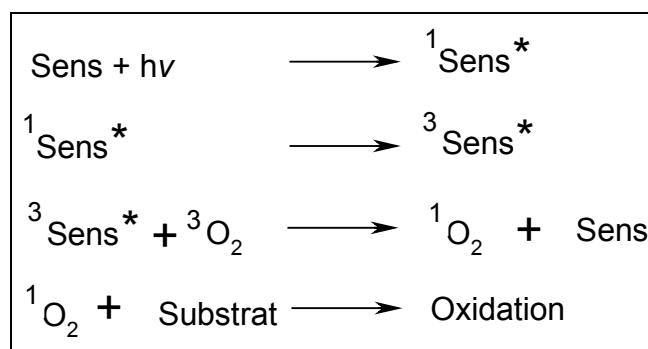


Abb. 4: Reaktions-Schema für die Oxidation in der Tumorzelle

Singlett-Sauerstoff ist die biologisch relevante physikalisch angeregte Form des Sauerstoffmoleküls. Im Gegensatz zum Sauerstoff im Grundzustand besitzt der Singlett-Sauerstoff π -Elektronen mit antiparallelem Spin. Daher sind seine Reak-

tionen mit anderen Atomen und Molekülen im Grundzustand nicht Spin-verboten und laufen mit schnellen Raten ab.

2.3.2 Singlett Sauerstoff als cytotoxisches Reagenz

1976 konnte *K. Weishaupt* Singlett-Sauerstoff als cytotoxisches Reagenz in der photodynamischen Therapie nachweisen [27]. Er verwendete hierfür TA-3 Zellen, welche 2 h in einer Kulturlösung mit einer Konzentration von 4,5 mmol HPD gehalten wurden. Die Zellen wurden anschließend mit rotem Licht in einem Wellenlängenbereich zwischen 610 und 630 nm bestrahlt. Bei der Verum-Probe sank die Zellenzahl auf 10% der Kontrollgruppe. In einem weiteren Versuch setzte *Weishaupt* dem Kulturmedium nicht nur HPD zu, sondern auch 1,3-Diphenyl-isobenzofuran zu. Diese Substanz ist als guter Quencher für Singlett-Sauerstoff bekannt. Bei der zweiten Versuchsreihe wurde jedoch eine wesentlich geringere Mortalitätsrate gefunden. Die überlebenden Zellen wurden lysiert und untersucht. Gaschromatographisch wurden große Mengen an o-Dibenzoylbenzen nachgewiesen, was dem Reaktionsprodukt von 1,3-Diphenyl-isobenzofuran und Singlett-Sauerstoff entspricht.

2.4 Wirkmechanismen der Photodynamischen Therapie

Um den Mechanismus der Abtötung der Tumorzellen durch Singlett-Sauerstoff zu verstehen, ist die Kenntnis der zellulären Verteilung der Photosensibilisatoren notwendig. Dabei spielt der Aufnahmeweg des Farbstoffes in die Zelle eine wichtige Rolle. Er reicht von passiver Diffusion bis zum aktiven, rezeptorvermittelten Transport durch die Zellmembran, abhängig vom Photosensibilisator- und Zelltyp. So konnte ein passiver Diffusions-kontrollierter Transport in die Zelle für das Haemtoporphyrin-Derivat nachgewiesen werden [28]. Wo hingegen nicht-spezifische Endocytose bei N-Monoaspartylchlorin e_6 und den sulfonierten Aluminium-Phthalocyaninen der Aufnahmemechanismus darstellt.

In der PDT sind zwei grundsätzlich verschiedene Wirkmechanismen der Photosensibilisatoren bekannt: zelluläre und vaskuläre Effekte.

2.4.1 Zelluläre Effekte

Die Photodynamische Therapie schädigt in den Tumorzellen eine Vielzahl von subzellulären Organellen und Enzymen. Die entstehenden Schäden sind abhängig von dem verwendeten Photosensibilisator, der Transportmethode in die Tumorzelle und auch der Tumorart.

Die unspezifische Wirkungsweise des Singlett-Sauerstoffes gestattet es nicht einen molekularen Mechanismus aufzustellen, sondern nur generelle Schadensbilder zu beschreiben [29, 24].

Kurze Zeit nach der Bestrahlung bilden sich auf der Zelloberfläche Blasen. Diese Blasen deuten auf Lipidoxidation und Protein-Linking von Membranbestandteilen hin. Im weiteren Verlauf der Bestrahlung bricht an diesen Stellen die Membranintegrität zusammen und die Zerstörung der Membranpermeabilität folgt. Dadurch strömen vermehrt Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} und Mg^{2+} Ionen in die Zelle, die bestimmte Enzyme erheblich stören können. Diese Inaktivierung der Membranenzyme verhindert die Aufnahme von Glukose, Aminosäuren oder Nukleotide in die Zelle.

Durch die Lokalisation von Photosensibilisatoren in Lysosomen, werden diese bei Bestrahlung durch die freigesetzten Radikale aufgebrochen. Die in den Lysosomen vorhandene Enzyme können nun ungehindert in das Cytosol eindringen. Unter anderem wird Ceramid freigesetzt, welches Apoptose auslösen kann. Diese Beschädigung der Lysosomen ermöglicht es den Sensibilisatoren auch in das Zellinnere zu diffundieren und dort weitere Zellorganelle anzugreifen [30].

Ein weiterer Wirkungsmechanismus ist die Störung der Phosphorylierung verschiedener Proteine. Nur bei wenigen Peptiden, wie zum Beispiel dem Epithel-Wachstums-Faktor Rezeptor (EGFR), gelang es eine direkte Schädigung festzustellen. Der EGFR besitzt eine wichtige Funktion bei der Regulation von Zellwachstum und -teilung.

Zwar wurden immer wieder Schäden wie Chromosomenaberrationen und Strangbrüche an der DNA der Tumorzelle beobachtet, diese dürften gemessen an den Gesamtschäden der Zelle jedoch unbedeutend sein, da nur geringe Konzentrationen der Photosensibilisatoren in den Nukleus gelangen [28].

In den letzten Jahren ist es gelungen, den molekularen Mechanismus der Apoptose bei der Behandlung mit Photosensibilisatoren zu klären [31]. Insbesondere die Hauptangriffspunkte der kationischen Wirkstoffe sind in den Mitochondrien lokalisiert. Es kommt sehr schnell zur Induktion der Apoptose innerhalb der Krebszelle.

Noch während der Bestrahlung des Gewebes kann man ein Abfallen des Membranpotentials der Mitochondrien feststellen [32]. Dies geschieht wahrscheinlich durch Öffnung eines großen Membrankanals, der sogenannten mitochondrialen Übergangspore. Die Aufgabe dieses Kanals ist noch nicht genau geklärt, aber durch Öffnung der Pore kommt es zum Ausstrom von Ca^{2+} Ionen aus den Mitochondrien und damit zur Depolarisierung.

Mit der Freisetzung von Ca^{2+} Ionen wird gleichzeitig Cytochrom c im Cytosol nachgewiesen [33]. Dieses Ereignis hat für die Zelle zwei Konsequenzen. Zum einen wird die ATP-Produktion erheblich gestört, zum anderen werden die Caspasen aktiviert. Das freigesetzte Cytochrom c bildet mit dATP, dem Apoptose-Aktivierungsfaktor 1 und der Procaspase 9 einen Komplex. Dieser fördert die Bildung weiterer Procaspase 9 und die Aktivierung dieser zu Caspase 9. Caspase 9 ermöglicht die Freisetzung von Procaspase 3 und im nächsten Schritt die Bildung von Caspase 3. Als Schlüsselement der Apoptose ist Caspase 3 für die Bildung des DNA-Fragmentierungs-Faktors und der Poly-(ADP-ribose)-polymerase verantwortlich [34].

Die Auslösung der Apoptose durch die Caspase 3 ist für die Zelle jedoch nicht irreversibel. Eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegenüber Apoptose spielt das in der Mitochondrienmembran, aber auch im Endoplasmatischen Reticulum und in der Kernmembran vorliegende Bcl-2 Protein. Durch eine Blockierung der Expression von Bcl-2 wurden MGC-803 Zellen erheblich anfälliger gegenüber PDT-induzierter Apoptose [35].

Der Schutzmechanismus von Bcl-2 bei der Apoptose ist noch nicht geklärt. Als gesichert gilt, dass es weiterhin zur Freisetzung von Cytochrom c kommt, allerdings nicht zur Aktivierung der Caspase 3 und damit zur Apoptose.

2.4.2 Vaskuläre Effekte

Vaskuläre Schäden spielen bei der Bekämpfung der Tumorzellen durch die PDT bei bestimmten Typen von Photosensibilisatoren, beispielsweise Photofrin, eine wichtige Rolle. Die Zerstörung des empfindlichen Netzwerkes der Blutgefäße verhindert die ausreichende Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff [23].

Der Mechanismus der Tumorerstörung durch vaskuläre Effekte ist sehr komplex, denn sowohl der Tumor, die Mikrovaskulatur als auch das vaskuläre Stroma sind

betroffen. Es gilt als gesichert, dass das vaskuläre Endothelium das Primärziel zur Auslösung dieses Effektes ist.

Durch die ersten Schäden der Endothelzellen und Erythrocyten kommt es zu physikochemischen Veränderungen der Gefäßwand. Der Blutfluss wird verringert und es lassen sich Anzeichen von Hämostasie und Thrombosen erkennen, während durch die vergrößerte Permeabilität der Endothelzellen das Blut Serumproteine und Flüssigkeit verliert. Die Reduktion der Blutversorgung führt zu Ödemen und Hämorrhagien im Tumor, durch die gleichzeitige Freisetzung von lysierenden Substanzen wie Proteasen wird die Schädigung verstärkt.

Der molekulare Mechanismus dieser vaskulären Effekte ist noch nicht aufgeklärt. Zur Zeit wird angenommen, dass sich das Gleichgewicht zwischen Prostacyclin und Thromboxan A₂ verschiebt. Prostacyclin, welches in den Endothelzellen synthetisiert wird, inhibiert die Plättchenaggregation und wirkt als Vasodilator. Thromboxan A₂ ist der molekulare Gegenspieler von Prostacyclin, es wirkt als Promotor der Aggregation der Blutplättchen und gleichzeitig gefäßverengend. Durch die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Prostacyclin und Thromboxan A₂ entsteht eine Kaskade von Folgeschäden [36].

2.5 Drug Targeting in der PDT

In der Krebstherapie erzielte die PDT einige Erfolge, aber verglichen mit den konventionellen Chemotherapeutika, besitzt auch sie nur eine geringe Tumorspezifität. Um die Spezifität der PDT zu verbessern, wurden schon früh große Anstrengungen unternommen, wie beispielsweise die Synthese einer Vielzahl neuer Photosensibilisatoren. In einem weiteren Ansatz wurden unterschiedliche Träger für die photoaktiven Verbindungen eingesetzt. Zu den untersuchten Transportsystemen gehören Liposomen, Serumproteine, Microsphenen und Antikörper.

2.5.1 Liposomen

Ziel des Einsatzes von Liposomen [37, 38] ist der Transport hydrophober Photosensibilisatoren wie Phthalocyanine oder Haematoporphyrin zum Tumor. Erste Versuche wurden mit HPD und Liposomen aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) bei Mäusen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Aufnahmegeschwindigkeit des Photosensibilisators durch den Träger zwar vermindert wurde, aber der liposomal

gebundene Wirkstoff erreichte eine etwa doppelt so hohe Endkonzentration im Gewebe wie das freie Porphyrin. Es folgten Experimente mit unterschiedlichsten Photosensibilisatoren und Liposomen-Systeme: ZnPc wurde mit Hilfe von Liposomen aus DPPC oder DPPC mit 15% Cholesterol oder Palmitoylstearylphosphatidylcholin und Dioleoylphosphatidylserin transportiert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Liposomen die Bioverfügbarkeit der Photosensibilisatoren im Körper verändern. Ein Vorteil des Einsatzes dieser Trägersysteme ist eine Steigerung der Tumorselektivität der verwendeten Photosensibilisatoren.

2.5.2 Serumproteine

Intravenös injizierte Photosensibilisatoren bilden relativ schnell Komplexe mit Serumproteinen [39]. Hierbei entscheidet die Hydrophilie der Sensibilisatoren mit welchen Proteinen eine Bindung eingegangen wird. Hydrophobe Wirkstoffe binden an Lipoproteine, hydrophile Phototherapeutika knüpfen eine Bindung zu Albumin.

In Folge der Anlagerung an Lipoproteine geringer Dichte (LDL) wird die Aufnahme von hydrophilen Photosensibilisatoren verbessert. Schnell wachsende Zellen, wie Tumorzellen, benötigen für ihre Membransynthese große Mengen an LDL. Diese Zellen besitzen deshalb eine erhöhte Anzahl an LDL-Rezeptoren, um ihren Bedarf decken zu können. Durch Endocytose gelangt das LDL und damit der Wirkstoff in die Tumorzelle.

2.5.3 Monoklonale Antikörper

Schon früh wurde den Entwicklern von Cytostatika, aber auch der PDT, klar, dass die fehlende Tumorspezifität das größte Problem bei der Bekämpfung von Krebs darstellt. Die Bindung des Wirkstoffes an einen monoklonalen Antikörper, welcher ein Antigen der Tumorzelle erkennt, kann die Tumorspezifität deutlich verbessern.

Die Kopplung von Photosensibilisatoren an monoklonale Antikörper reduziert deren Selektivität [40]. Da aber die Sensibilisatoren erst bei Bestrahlung mit geeignetem Licht Singlett-Sauerstoff bilden, dürften die Kreuzreaktionen des Antikörpers mit gesundem Gewebe nur geringe unerwünschte Wirkungen bei den Patienten hervorrufen.

Bei der konventionellen Methode, der direkten Anknüpfung der Photosensibilisatoren an den Antikörper, verliert dieser seine Selektivität, sobald er mit mehr als 6 Farbstoffmolekülen verbunden wird [41]. Die maximale Anzahl von 5 Sensibilisatoren die mit einem Antikörper gekoppelt werden können, bilden jedoch ein für die PDT ungenügendes Verhältnis von Antikörper zu Wirkstoff. Eine Möglichkeit zur Verbesserung dieser Schwachstelle stellen die sogenannten Polymer-Chromophor-Konjugate [42] dar. Bei dieser Technik werden die Sensibilisatoren an ein geeignetes Polymer, beispielsweise Polyglutaminsäure, gebunden. Dieses Polymer wird wiederum über einen Spacer mit dem monoklonalen Antikörper verknüpft. An den Antikörper waren über den Spacer und Polymer insgesamt 36 Photosensibilisatormoleküle gebunden. Bei dem entstehenden Konjugat wird das Absorptionsspektrum des Farbstoffes geringfügig in den roten Bereich verschoben. Die Bindungsaktivität des Antikörpers-Sensibilisatoren-Konjugates wurde mit Radioimmunassays überprüft. Bei diesem Test erreicht das Konjugat etwa 70% der Bindungsaktivität eines freien Antikörpers.

Obwohl die genaue Bindungsstelle der Antikörper an den Tumorzellen noch nicht bekannt ist, kann man aufgrund der kurzen Diffusionsstrecke des Singlett-Sauerstoffes annehmen, dass hauptsächlich die Zellmembran angegriffen wird. Obgleich diese Konjugat-Technik eine erhebliche Verbesserung gegenüber den direkt gebundenen Photosensibilisatoren darstellt, sollte erwähnt werden, dass bei intravenöser Applikation freier Sensibilisatoren in den Tumorzellen eine 200 bis 1000fach höhere Konzentration der Wirkstoffe erreicht wird [43].

2.5.4 Nukleäre Rezeptoren

Ein Transport in den Kern von Tumorzellen steigert die Effektivität der PDT erheblich. Allerdings müssen alle Transporte in oder aus dem Nucleus die Kernmembran passieren. Dies geschieht mit Hilfe des *Kern-Poren-Komplexes* (NPC), durch dessen Kernöffnung kleine Proteine bis 40 kDa ungehindert hindurch diffundieren können [28]. Größere Proteine benötigen für den Transport eine Zieladresse, die *nuclear localisation sequence* (NLS), um in den Kern gelangen zu können.

Im ersten Schritt docken die NLS-Peptidstücke an die NPC an. Bei Erkennung der NLS öffnet sich die Pore und das Protein gelangt durch einen aktiven Transportmechanismus in den Zellkern.

Im Experiment wurden Adenoviren mit Carriern bestückt, die sich aus einer NLS und Chlorin e₆ als Photosensibilisator zusammensetzten. Humane PLC-Hepatoma-Zellen wurden mit den präparierten Viren ($3,7 \cdot 10^{10}$ Viren/ml) für 18 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem Reinigungsschritt wurden die Zellen mit rotem Licht bestrahlt. Für die Photosensibilisatoren, die mit den NLS in den Zellkern gelangt waren, konnte eine EC₅₀ Dosis von 0,13 nmol/L bestimmt werden, freies Chlorin e₆ besitzt hingegen einen EC₅₀-Wert von 320 nmol/L.

Der erfolgreiche Versuch zeigt die Möglichkeit eines idealen Drug Targetings für die PDT auf. Hierbei müssen jedoch drei Voraussetzungen erfüllt sein: 1. ein Ligand zur spezifischen Tumorerkennung, 2. die endocytotische Aufnahme des Carriers mit den Photosensibilisatoren und 3. eine NLS, welche den Carrier in den Kern schleust.

2.5.5 Rezeptorliganden

Eine schon mehrfach untersuchte Methode, die Spezifität der Photodynamischen Therapeutika zu steigern, ist es, den Wirkstoff an einen tumorspezifischen Liganden zu koppeln. Erste Versuche wurden mit einfachen Liganden, wie beispielsweise LDL, spätere mit komplexeren Molekülen durchgeführt.

Hamblin und *Newman* [44] koppelten HPD mit Transferrin, der entstandene HPD-Transferrin-Komplex lag hier als Monomer vor. An jedes Transferrin-Protein wurden etwa 5 - 6 Moleküle HPD gebunden. Durch Messung der Fluoreszenz der in die Zellen aufgenommenen Farbstoffe konnte gezeigt werden, dass die Moleküle im Cytoplasma vorlagen. Bei der Inkubation mit freiem HPD war die stärkste Fluoreszenz jedoch an der Außenseite der Zellmembran zu beobachten. Diese Inkorporation in die Tumorzelle verbesserte die Effizienz des Wirkstoffes, allerdings war die Anzahl der aufgenommenen Photosensibilisatoren zu gering, um eine erfolgreiche Therapie durchführen zu können.

Intensiv wurde die Bindung der Wirkstoffe an den Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF) [45], der bei vielen Tumortypen, beispielsweise Blasenkrebs und Brustkrebs, stark exprimiert wird, untersucht. Die Photosensibilisatoren wurden entweder durch Dextran oder Polyvinylalkohol (PVA) an den Faktor gebunden. Die Bindungsaffinitäten der verschiedenen Komplexe untersuchte man an A431 Zellen, da diese etwa $2,6 \cdot 10^6$ EGF-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen. Die Messungen erfolgten durch die Verdrängung von radioaktiv markiertem EGF an den Rezeptoren. Der

EGF-PVA-Chlorin e_6 -Komplex verdrängte nur in geringem Maße das freie EGF am Rezeptor. Unter der Verwendung von Dextran als Linker stieg die Rezeptorbindung der Wirkstoffe auf etwa 40%. Insgesamt erzielten die EGF- und EGF-Dextran-Komplexe im Vergleich zu freiem PVA-Chlorin e_6 jedoch nur eine geringfügig verbesserte Zellaufnahme. Obwohl durch die Kopplung mit EGF eine gesteigerte Tumorspezifität festgestellt werden konnte, waren die Mengen an aufgenommenen Photosensibilisatoren zu gering, um eine erfolgreiche Therapie durchführen zu können. In einer weiteren Studie [46] wurden die Photosensibilisatoren an bovines Serum-Albumin (BSA) gebunden. Durch eine zusätzliche Kopplung mit Insulin, erhielt man einen BSA-Chlorin-Insulin-Komplex im Verhältnis 1:13:16.

Bindungsstudien an PLC/PRF/5-Zellen zeigten, dass die Zellen jeweils 19.000 Moleküle an freiem Insulin aber auch des Wirkstoff-Komplexes internalisierten. Freies Insulin inhibierte jedoch die Endocytose des Komplexes, was auf eine spezifische Aufnahme durch den Insulin-Rezeptor hindeutet. In phototoxischen Tests wurde die Überlegenheit des BSA-Insulin-Chlorin-Komplexes gegenüber den freien Photosensibilisatoren gezeigt. Der Komplex besaß mit 27 nM einen EC_{50} -Wert, welcher um den Faktor 100 kleiner war als der Wert des freien Chlorin e_6 . Ein weiterer Vorteil war der Transport des Insulin-Komplexes in den Nucleus. Die Erbsubstanz ist sehr empfindlich gegenüber Singlett-Sauerstoff, so dass man die Bestrahlungsintensität verringern konnte.

James et al. [47] verknüpften Östrogen über einen Linker mit einem Photosensibilisator. Der aus 8 Atomen bestehende Linker wurde mit der 11β -Hydroxylgruppe des Steroidgerüsts verestert, da diese Position chemische Veränderungen, in Hinblick auf die biologische Wirksamkeit des Hormons, toleriert. Die biologische Aktivität dieses Konjugates **13** wurde mit einem kompetitiven Bindungs-Assay bestimmt. Die Ergebnisse zeigten die charakteristischen Konzentration abhängige Bindungskurven, allerdings war die Affinität des Konjugates zum Rezeptor deutlich verringert. Der EC_{50} -Wert für das freie Östrogen betrug 1 nM, für das Konjugat hingegen 274 nM.

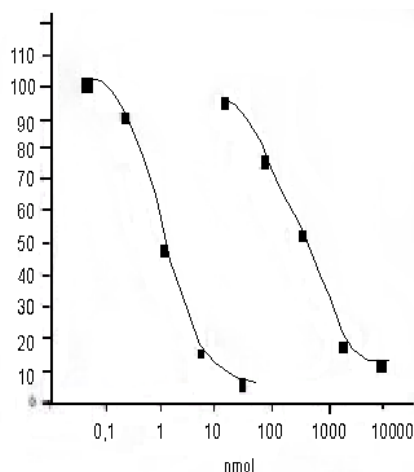
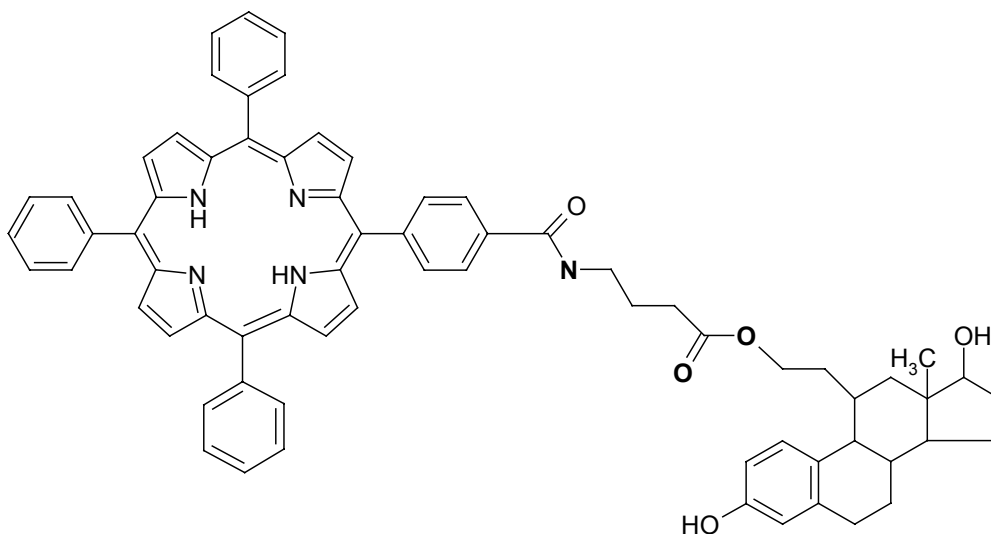


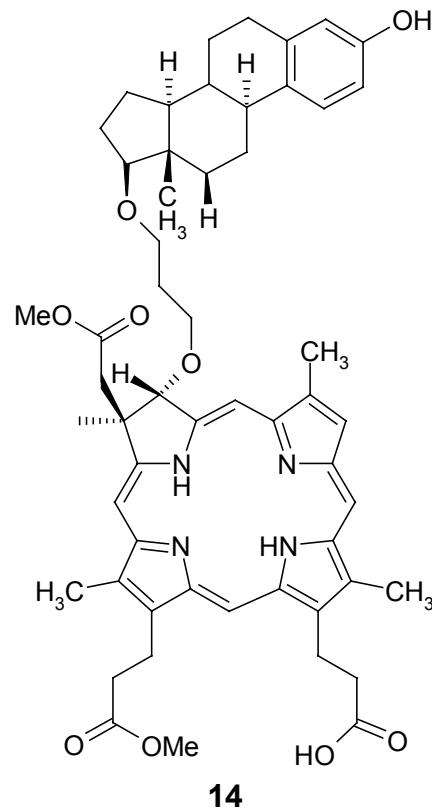
Abb. 5: EC_{50} Werte für freies Östrogen und das Konjugat 13

Es wurde auch der Einfluss von Östrogen auf die photochemische Eigenschaften des Sensibilisators untersucht. Der Absorptionspeak bei 650 nm verringerte sich um 27%, der Peak bei 604 nm hingegen wuchs um 1220%.



13

In einem weiteren Ansatz verknüpfte *Bats* und *Montforts* [48] ein Hydrochlorin mit Östrogen **14**. Die Bindung erfolgt über einen kurzen Spacer an der 17-Position des Steroids an die Hydroxylgruppe in der 3-Position des Hydrochlorin. Es gelang aber nicht größere Ausbeuten des Konjugats **14** für eine biologische Testung zu erhalten.



2.6 Der Progesteron - Rezeptor

Hormone sind chemische Boten, welche die Aktivitäten verschiedener Zellen in einem vielzelligen Organismus koordinieren. Der Begriff „Hormon“ wurde 1904 von *W. Bayliss* und *E. Starling* geprägt, um die Wirkung des Sekretins zu beschreiben, einer von *Duodenum* ausgeschiedene Substanz, die den Pankreas stimuliert.

Hormone üben ihre regulatorischen Effekte nicht direkt aus, sondern binden an Rezeptoren. Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren kommt es zur Induktion von Enzymen, indem die spezifische Genaktivierung eingeleitet wird.

2.6.1 Aufbau des Progesteron - Rezeptors

Der Progesteron-Rezeptor ist innerhalb der Steroid-Rezeptorfamilie einzigartig, da er aus zwei Proteinen, PR-A und PR-B, aufgebaut ist. Das Molgewicht der beiden humanen Komponenten wurden mit 98 kDa und 86 kDa aus der komplementären DNA errechnet. Beide Proteine werden aus dem identischen mRNA-Strang translatiert [49].

In Abwesenheit des Progesterons liegt der Rezeptor im Cytosol vor, sobald er das Hormon gebunden hat, wandert das Hormon-Rezeptor-Konjugat in den Nucleus. In

Abwesenheit ihrer spezifischen Liganden sind Steroid-Rezeptoren inaktiv. Der inaktive Zustand wird durch Assoziierung weiterer Proteine an den Rezeptor erreicht. Im Falle des Progesteron-Rezeptors stellt dieses ein Hitzeschock-Protein mit einem Molekulargewicht von 90 kDa (HSP90) dar. HSP90 ist ein stark konserviertes Eiweiß [50]. Aus diesem Grund kann der humane Progesteron-Rezeptor den inaktiven Zustand auch mit Affen- oder Kaninchen-HSP90 bilden. Neuere Forschungen zeigen, dass pro Rezeptor jeweils zwei HSP90 Proteine erforderlich sind (Abb. 6). Die Zugabe von Hormonen zu den Zellen veranlasst eine Transformation des inaktiven in den aktiven Zustand.

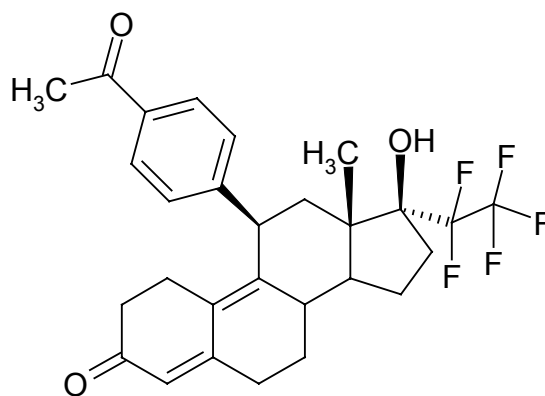
Die Bindungsdomäne des Progesteron-Rezeptors für das Hormon liegt am C-Terminus des Proteins und umfasst etwa 250 Aminosäuren. Dieser Bereich ist sehr empfindlich gegenüber Punktmutationen oder -deletionen. In Abwesenheit von Progesteron bindet der Rezeptor weder an die DNA noch beeinflusst er die Transkription der Gene. Nach der Entfernung der Hormon-Bindungsdomäne des Rezeptors kann sich das verbleibende Rezeptor-Protein an die DNA binden und die Transkription starten [51].

Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass die Bindungsdomäne ein Suppressor der eigentlichen Rezeptorfunktion ist.

2.6.2 Progesteron - Antagonisten

Das Hormon Progesteron spielt eine wichtige Rolle bei der Schwangerschaft von Säugetiere, aber auch beim Menschen. Aufgrund dieser Tatsache werden Progesteron-Antagonisten für die Schwangerschaftskontrolle intensiv erforscht. Die ersten Antagonisten besaßen nur eine geringe Selektivität gegenüber dem Progesteron-Rezeptor, sie blockierte auch andere steroidale Hormon-Rezeptoren, beispielsweise den Glucocorticoid-Rezeptor [52]. Der Durchbruch bei der Synthese von selektiven Progesteron-Antagonisten gelang 1982 dem Pharmaunternehmen Roussel-Uclaf mit der Verbindung RU-486 (Mifepriston).

Die Erforschung der Struktur-Wirkungsbeziehung bei der Entwicklung neuer Progesteron-Antagonisten ermöglichte spezifischere Wirkstoffe zu erhalten [53]. Die neuesten Progesteron-Antagonisten besitzen neben der charakteristischen 11- β -Phenylgruppe, an Position 17- α eine Pentafluor-ethylgruppe **15**.

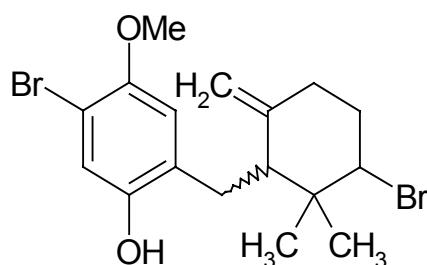
**15** (ZK 230211)

Diese neue Gruppe von Antagonisten besitzt eine höhere Selektivität gegenüber den verschiedenen Steroidrezeptoren als die klassischen steroidal Antagonisten, beispielsweise Mifepriston. Die Spezifität für ZK 230211 konnte gegenüber Mifepriston um den Faktor 10 gesteigert werden (Tab. 2).

	ZK 230211	MIFEPRISTON
PR-A	0,0036 nmol	0,028 nmol
PR-B	0,0025 nmol	0,025 nmol

Tab. 2: Vergleich der IC₅₀ Konzentrationen bei den beiden Subtypen des Progesteron-Rezeptors.

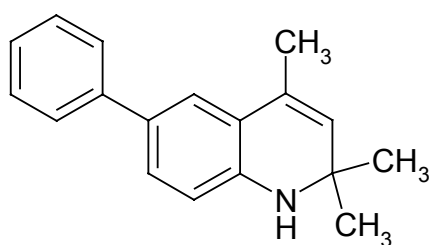
Neben diesen steroidal Antagonisten werden seit geraumer Zeit auch nicht-steroidale Antagonisten erforscht. 1995 wurde aus der Meeresalge *Cymopolia barbata* eine neue Klasse von Progesteron-Antagonisten gewonnen [54]. Dieser Naturstoff **16** liegt in 2 Enantiomeren vor, wobei beide biologisch aktiv sind. Das R-Isomer inhibiert selektiv den Progesteron-Rezeptor, während das S-Isomer schwach agonistische Eigenschaften aufweist.

**16**

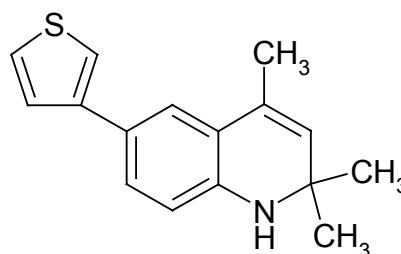
	PR	AR	GR
Onapriston	2,2	-	-
16	10	150	35

Tab. 3: Vergleich der IC₅₀ Werte in nMol

Eine weitere Klasse von nicht-steroidalen Progesteron-Antagonisten stellen die 6-Phenylhydroquinoline **17** bzw. 6-Thiophenylhydroquinoline **18** dar [55]. Die 6-Phenylhydroquinoline zeigten bei Bindungsstudien antagonistische Eigenschaften für den Progesteron-Rezeptor, allerdings mit nur geringer Selektivität, da sowohl der Glukocorticoid- als auch der Androgen-Rezeptor blockiert wird (Tab. 4).

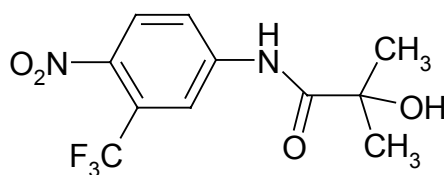


17



18

Von den Flutamiden, welche als Androgen-Antagonisten wirken, wurden die Hydroxyflutamide **19** abgeleitet [55]. Diese Molekülklasse können auch als Progesteron-Antagonisten fungieren, allerdings besitzen sie aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaften mit den Flutamiden nur eine sehr geringe Selektivität für den Progesteron-Rezeptor.

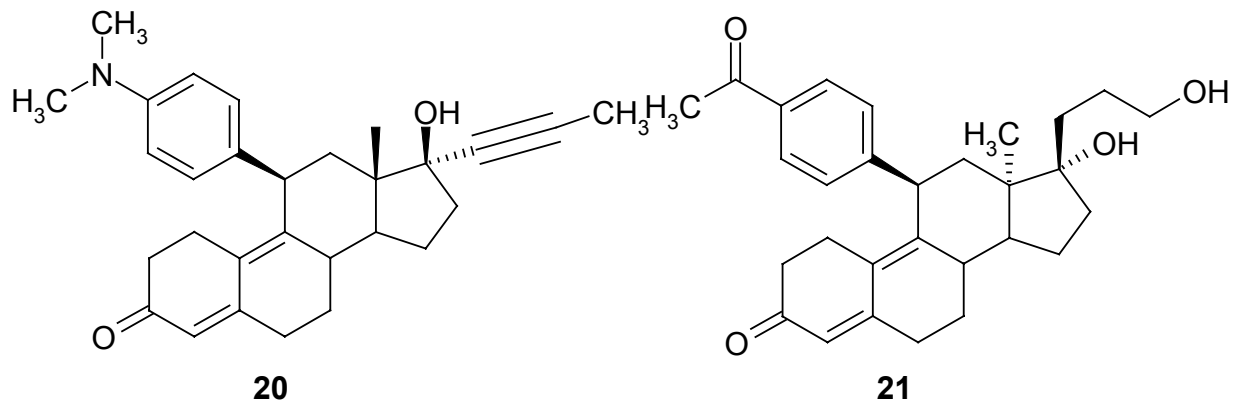


19

Neben der Charakterisierung der Verbindungen aufgrund ihrer chemischen Konstitution, können die Antagonisten auch in ihrer inhibitorischen Wirkungsweise unterschieden werden.

Typ-1-Antagonisten, beispielsweise Mifepriston **20**, erlauben dem Rezeptor an die DNA zu binden, aber es kommt zu keiner Transkription der Gene. Die Typ-2-

Antagonisten, welche durch Onapriston **21** repräsentiert werden, verhindern eine Interaktion des Rezeptors mit der DNA [56].



2.6.3 Progesteron relevante Krebsarten

Bereits 1947 veröffentlichte Bittner [57] die Hypothese, das Hormone bei der Krebsentstehung eine wichtige Rolle spielen. Ein Schlüsselement seiner Theorie ist, dass die Neoplasien eine Konsequenz der extremen Hormonstimulation des Zielorgans ist. Dieses Konzept der Krebsentstehung veränderte die Therapie der hormonabhängigen Krebsarten.

Brustkrebs

Das Mamakarzinom ist die verbreitetste Krebsart bei Frauen. Zur Zeit gehen die Onkologen davon aus, dass die Östrogene, insbesondere das Östradiol, zu den Hauptverursachern dieser Krebsart gehören. Die gleichzeitige Anwesenheit von Progesteron erhöht nochmals die Proliferationsrate der Tumorzellen. Ein typisches Merkmal dieser Tumorzellen ist die Überexpression der Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren.

Endometriumkrebs

Eine weitere Progesteron-abhängige Tumorart ist das Endometriumkarzinom. Die hormonellen Ursachen für diese Erkrankung sind gut untersucht. Die Anwesenheit von Progesteron reduziert die Anzahl der Östrogen-Rezeptoren der Tumorzellen, bei gleichzeitiger Aktivierung eines Enzymsystems, welches das Östradiol zu Östron abbaut. Dieses Östron besitzt eine deutlich reduzierte Affinität zu den Östrogenrezeptoren. Weiterhin ermöglicht die Anwesenheit von Progesteron den Zellen sich zu sekretorischen Zellen zu differenzieren.

Weitere Tumorformen

Sowohl beim Ovarial- als auch beim Prostatakarzinom überexprimieren die Tumorzellen den Progesteron-Rezeptor, wenn gleich für diesen Rezeptor noch keine aktive Rolle bei der Tumorentstehung bekannt ist.

2.7 Anwendungen der PDT

Zur Zeit ist die Photodynamische Therapie nur für 2 Indikationen in Deutschland zugelassen: seit 1997 für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome und seit 2000 für die altersbedingte Makulardegeneration. Weitere Indikationen sind in Vorbereitung oder in anderen Ländern bereits zugelassen.

2.7.1 Bronchialkarzinome

Bei Bronchialkarzinomen wird Photofrin® in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht in einer wässrigen 5%igen Dextrose-Lösung verabreicht. Etwa 40 bis 50 h nach der Injektion wird der Tumor mit Licht der Wellenlänge von 630 nm bestrahlt. Dies geschieht durch eine endoskopische Fiberoptik und einem geeigneten Farblaser. Innerhalb der nächsten 48 h wird das nekrotische Tumorgewebe entfernt. Bei Bedarf kann noch eine zweite Laserbehandlung erfolgen [15].

In der wissenschaftlichen Literatur waren bis 1986 etwa 500 Patienten bekannt, bei denen Lungenkrebs mit der Photodynamischen Therapie behandelt wurde [58]. Die Heilungsraten der unterschiedlichen Studien stimmen im größeren Rahmen überein. Die Patienten wurden allerdings durchschnittlich nur 2 Jahre beobachtet. Die besten Ergebnisse erhielt man bei Patienten, bei denen der Krebs in einem frühen Stadium behandelt wurde. Eine klinische Prüfung nahm auch Patienten auf, die aufgrund ihres schlechten Zustandes nicht operiert werden konnten. Bei 80% dieser Patienten stellte sich eine Verbesserung des allgemeinen Zustandes ein [59].

QLT Ltd. und Lederle Laboratories validierten zwischen 1983 und 1988 diese Daten in unabhängigen Tests durch 3 Klinikzentren mit 170 Patienten [60]. Es wurde zwischen komplettem Erfolg, d.h. keinen sichtbarer Tumor, und einem Teilerfolg, mindestens 50%ige Verkleinerung des Tumors nach der Behandlung, unterschieden. Für den kompletten Erfolg erhielt man Raten von 50 bis 76%. Die Daten für den Gesamterfolg, Kompletterfolg und Teilerfolg addiert, lagen zwischen 75 und 78%.

Allerdings starben 8 Patienten (4,7%) nach der Behandlung mit PDT an Hämorrhagie innerhalb der Lunge.

2.7.2 Altersbedingte Makuladegeneration

Die altersbezogene Makuladegeneration gehört zu den häufigsten Erblindungsursachen in Deutschland, circa 10 bis 15% der 70 bis 80-jährigen leiden unter dieser Erkrankung [61]. Betroffen ist die Netzhautmitte, welche für das Lesen und Erkennen von feinen Unterschieden benötigt wird. Erste Symptome der Erkrankung können verzerrtes Sehen und Störungen der Farbwahrnehmung sein. Im fortgeschrittenen Stadium erscheint ein grauer Fleck im zentralen Gesichtsfeld. Man unterscheidet bei der Makuladegeneration eine trockene und eine feuchte Form. Allerdings kann nur die feuchte Form mit der Photodynamischen Therapie behandelt werden. Bei diesem Typ bilden sich neue Gefäße in der Aderhaut. Von hier aus wachsen sie durch Defekte in der Bruch'schen Membran in den Raum unterhalb des retinalen Pigmentepithels und später auch unter die Netzhaut. In der Folge kommt es zum Untergang von Photorezeptoren und im Endstadium zur Vernarbung der Netzhautmitte.

Verteporfin[®] wird im Rahmen der PDT mit einer Konzentration von 6 mg/m² appliziert. Untersuchungen zeigten, dass Verteporfin[®] über den LDL Rezeptor aufgenommen wird [17]. Die Aufnahme des Wirkstoffes kann durch vorheriges Mischen mit LDL verbessert werden. In einer Phase III Studie konnte bei 63% der erkrankten Augen ein Fortschreiten der Krankheit verhindert werden. Bei 7% der Patienten kam es sogar zu einer Verbesserung der Sehleistung [19].

2.7.3 Blasenkrebs

Bei der Diagnose von Blasenkarzinomen befinden sich diese oft noch in einem frühen Stadium oder in situ. Normalerweise wird ein endoskopischer Eingriff zur Entfernung der Läsionen vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt besitzt das Karzinom nur eine geringe Dicke, was eine alternative Heilung durch die Photodynamische Therapie ermöglicht.

Insbesondere bei der Behandlung von Karzinomen in situ konnten gute Ergebnisse erzielt werden [62]. In einer Studie mit 47 Patienten wurde bei 46 Personen eine komplette Nekrose des Tumors erzielt.

2.7.4 Gastrointestinal-Trakt

Allein in den USA werden pro Jahr 10.000 Fälle von Speiseröhrenkrebs diagnostiziert. Bei rund 50% der Patienten ist der Tumor so weit fortgeschritten, dass er nicht operiert werden kann.

In drei Studien zur PDT-Behandlung wurden insgesamt 71 Patienten mit inoperablen Tumoren mit HPD, 3 mg/kg Körpergewicht, oder Photofrin[®], 2 mg/kg Körpergewicht, behandelt. Ein kompletter Erfolg wurde bei 44 Patienten (62%) festgestellt. Diese Patienten blieben weitere 3 bis 60 Monate tumorfrei [63].

2.7.5 Dermatologie

Die Photodynamische Therapie ist für die Dermatologie geradezu prädestiniert. Die betroffenen Hautstellen sind leicht zu erreichen und können ohne aufwendige Fiberoptik bestrahlt werden. Deshalb wurden schon viele Melanom-Arten oder anderen Hauterkrankungen mit der PDT behandelt. Trotz Erfolgen konnte sich in der Dermatologie noch kein einheitliches Behandlungsprotokoll herauskristallisieren.

Keratosis actinica

Die Lichtkeratosis betrifft Gesicht und Handrücken älterer Menschen bei chronischer Sonnenexposition. Es entsteht eine rot- bräunliche, leicht schuppene Erhebung, welche in ein Plattenepithelkarzinom übergehen kann.

In mehreren Studien wurden Patienten mit Keratosis actinica topisch mit 10 bis 30% igen ALA-Salben behandelt. Die Heilungsrate lag zwischen 30 und 90%, dabei war weniger die ALA-Konzentration von Bedeutung, sondern vielmehr die Lokalisation der betroffenen Hautstelle. Im Bereich von Kopf und Hals wurde eine Heilung in 90% der Fälle erreicht, während man für Hautpartien an den Extremitäten oder des Rumpfes nur 45% erzielte. Bei relativ dicken Hautläsionen fiel dieser Wert auf 30%. Interessanterweise wurde die besten Ergebnisse nicht mit der 30%igen, sondern mit der 20%igen Salbe erreicht. Verglichen mit anderen topischen Methoden, wie Behandlung mit flüssigen Stickstoff oder chemische Verätzungen, ist die PDT die für den Patienten angenehmste und effektivste Behandlung [64].

Bowens Krankheit

Bei der Morbus Bowens handelt es sich um ein Carcinoma in situ der Epidermes mit zahlreichen Zellatypien. Bei Nichtbehandlung der Krankheit ist ein Übergang zu einem invasiven Bowens-Karzinom mit Metastasierungsneigung möglich.

Die Bowens Krankheit spricht sehr gut auf die Photodynamische Therapie an. In einer Studie [65] wurden über 500 Läsionen dieser Erkrankungen mit 1,5 mg/kg bis 2,0 mg/kg HPD behandelt und mit einem gepulsten Gold-Dampf-Laser bestrahlt. Bei allen Patienten wurde eine komplette Nekrose der Läsionen erreicht und innerhalb der nächsten Monate kam es zu keinem Rückfall. In weiteren Studien wurden ebenfalls verschiedene Konzentrationen ALA eingesetzt. Die Resultate für einen kompletten Erfolg reichten von 50% (ALA mit Desferrioxamin und einer Halogenlampe als Strahlungsquelle) bis 100% (ALA und Laser). Auch hier ist die Photodynamische Therapie der konventionellen Kryotherapie mit flüssigem Stickstoff überlegen; insbesondere entstehen bei der Behandlung der Bowens Krankheit mit der PDT keinerlei Infektionen.

Basalzellkarzinom

Dieses Karzinom entsteht oft an lichtexponierten Stellen der Haut, ausgehend von embryonalen Haarkeimen. Dabei ist das langsame infiltrierende Wachstum ohne Metastasierung für die Tumorart charakteristisch.

Dieser Tumortyp gehört zu den meistbehandelten Krankheiten innerhalb der Dermatologie. Neben der systemischen wird meistens eine topische Applikation mit einer ALA-Konzentration von 20% angewendet. Dadurch konnten hohe Heilungsraten von 79 bis 100% erzielt werden. Allerdings gab es auch Studien, bei denen nur ein Erfolg bei 50% der Patienten beobachtet wurden. Eine inhomogene Aufnahme von ALA oder die ungleichmäßige Metabolisierung zu Pp IX könnte eine Erklärung hierfür sein. Denn mehrere Studien zeigten eine heterogene Fluoreszenz von Pp IX innerhalb der Tumore [66].

Insbesondere knotenartige Basalzellenkarzinome besaßen mit 10 bis 50% eine niedrige Heilungsrate. Die geringe Penetration von ALA in die tieferen Tumorschichten ist wahrscheinlich der Grund für das geschilderte Ergebnis. Die Erfolgsquote wurde durch eine mehrfache PDT-Behandlung auf bis zu 100% gesteigert. Bei einer einmaligen Applikation konnte die Heilungsrate mit einer Kombination von Dimethylsulfoxid (DMSO) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) auf 77% gesteigert werden.

Das Lösungsmittelgemisch verbesserte die unspezifische ALA-Aufnahme der Tumorzelle erheblich [67].

Zur Zeit ist die Photodynamische Therapie bei der Behandlung von Basalzellkarzinomen eine sichere und effektive Methode, allerdings ist ihr die konventionelle chirurgische Entfernung des Tumors überlegen, insbesondere bei größeren Läsionen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Tumorselektivität der Photodynamischen Therapie durch die Verknüpfung des Therapeutikums mit einem Antiprogestin zu steigern. Dieser Ansatz wurde gewählt, weil einige Tumorarten, beispielsweise Ovarial- und Prostatakarzinom, verstärkt Progesteron-Rezeptoren exprimieren. Die Verbindung der beiden Moleküle soll eine zweifache Selektivität der PDT ermöglichen: Der Wirkstoff wird vor allem in Geweben, welche vermehrt den Progesteron-Rezeptor ausbilden, akkumuliert und der reaktive Singlett-Sauerstoff entsteht nur in den bestrahlten Tumorgebieten.

Das Syntheseziel dieser Arbeit war es ein nichtsteroidales Antiprogestin über einen Spacer mit dem Phototherapeutikum zu verbinden (Abb. 7).

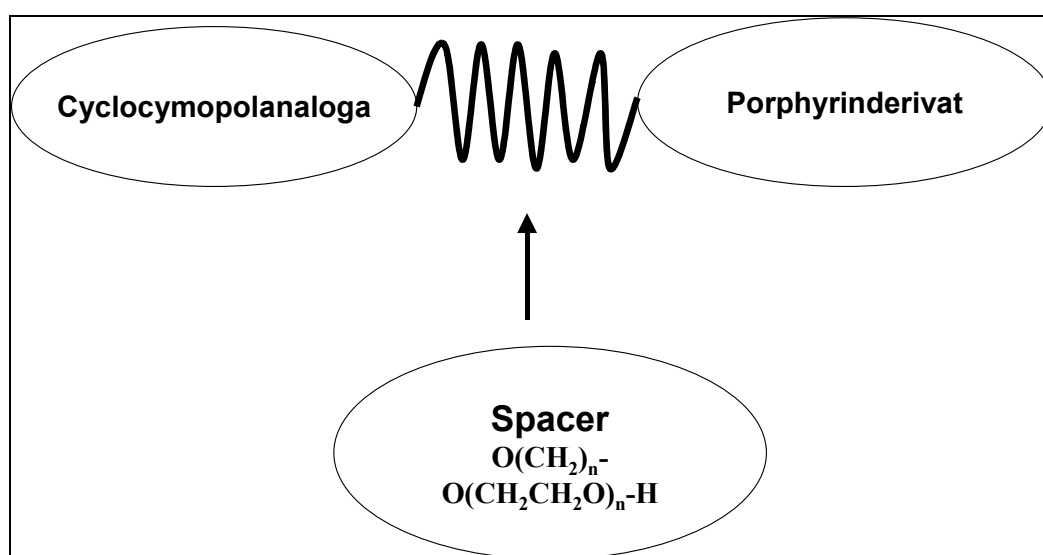


Abb. 7: Schema des Syntheseziel

Im Vergleich zur Synthese von nicht-steroidalen Antagonisten erfordert die Synthese von steroidalen Antagonisten einen deutlich höheren Aufwand (Abb. 10). Das Edukt für die Steroidsynthese ist der Östradiol-methylether. In mehreren Reaktionsschritten wird die Etherfunktion durch eine Aldehyd-Gruppe ersetzt. Diese Aldehydfunktion wird geschützt und anschließend in Position 11 das N,N-Dimethylanilin angeknüpft. In weiteren Schritten erfolgt die Einführung der Propin-Seitenkette in Position 17 des Steroidsgerüsts. Nach diesen Schritten erhält man durch Elimination von Wasser in Position 4 eine Doppelbindung. Im letzten Schritt wird die Aldehyd-Funktion geschützt [69].

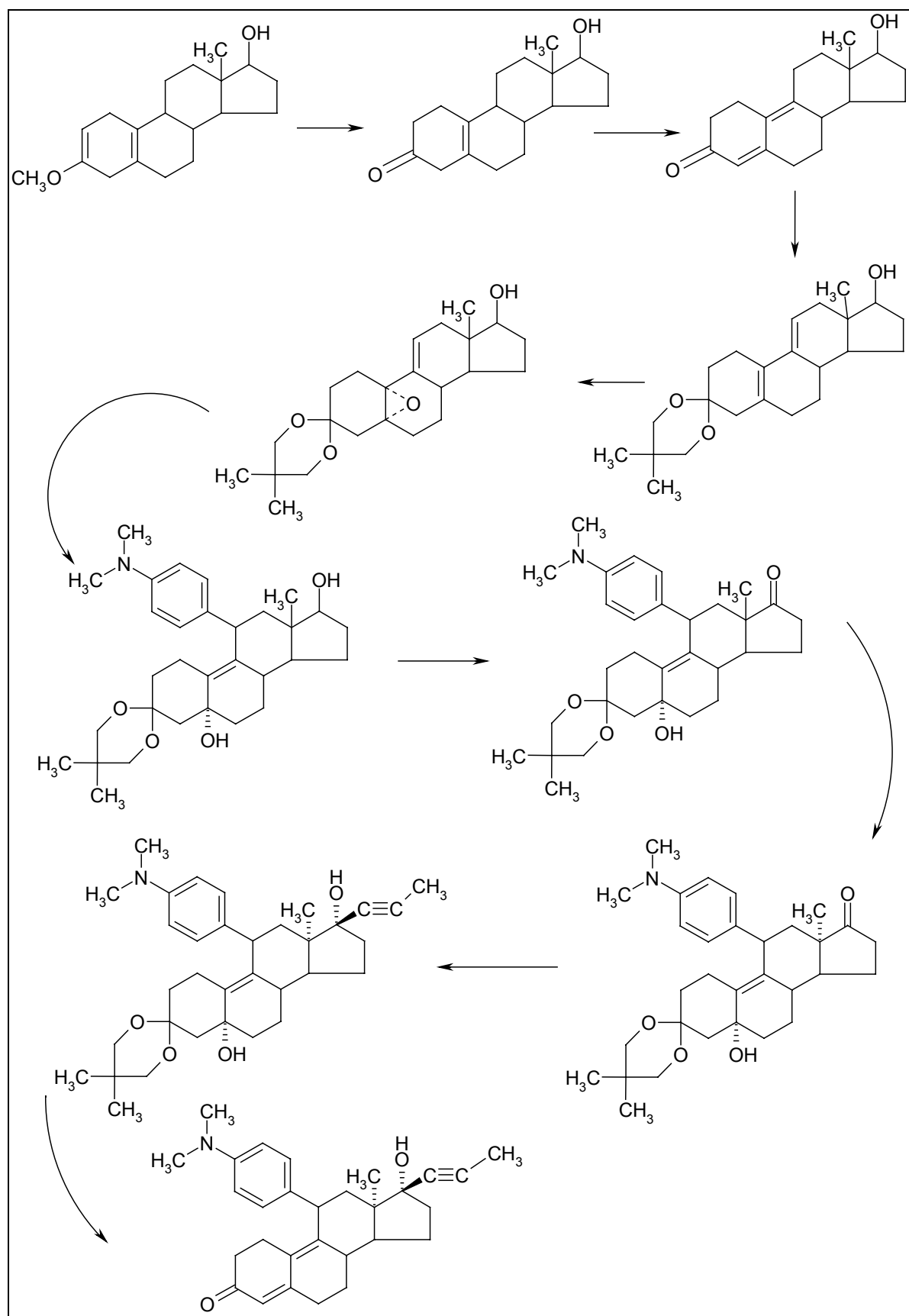
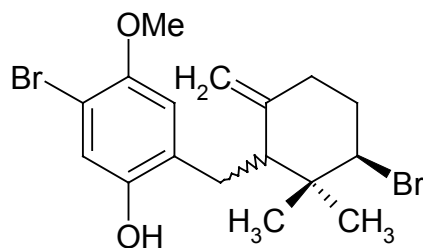


Abb. 8: Syntheschema für Mifepriston

Als Leitstruktur für den nichtsteroidalen Progesteron-Antagonisten diene der Naturstoff LG120019, ein Cyclocymopolmonomethyl-ether-derivat, welcher aus der marinen Alge *Cymopolia barbata* **16** isoliert wurde [68].

**16**

Der als Leitstruktur ausgewählte Cyclocymopolmonomethyl-ether **16** inhibiert den Progesteron-Rezeptor nach dem Typ I Wirkmechanismus.

Der Naturstoff besitzt, verglichen mit den steroidalen Antagonisten Mifepriston und Onapriston nur eine sehr geringe Affinität zu dem Progesteron-Rezeptor. Im Gegenzug ist die Selektivität von Cyclocymopolmonoethyl-ether deutlich besser.

	PR-A	GR	AR
Progesteron	3,5	30,5	8,5
Mifepriston	0,58	0,68	10,6
Onapriston	18	41,8	> 100
16	490	3.210	n.a.

Tab. 4: Bindungsaffinitäten ausgewählter Progesteron-Antagonisten für Steroid - Rezeptoren in nmol

Bei den Untersuchungen zu den Struktur-Wirkungs-Beziehungen (Abb. 8) zeigte sich, dass die elektronenziehende Gruppe am Aromaten (R_2) und die exocyclische Methylengruppe (R_4) für die biologische Wirkung essentiell sind.

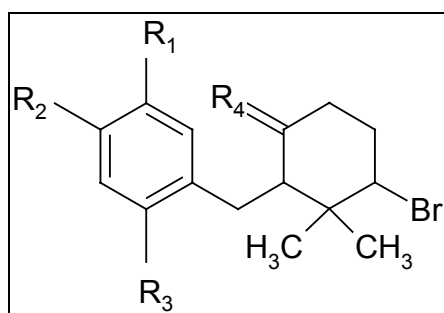
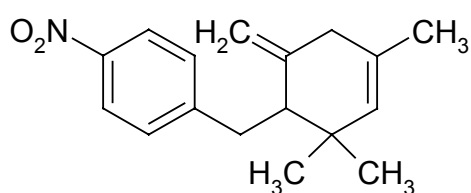


Abb. 8: Schema zur Struktur-Wirkungs-Beziehung

Eine Veränderung dieser Methylengruppe führt zu einem starken Aktivitätsverlust beziehungsweise zur Inaktivierung des Antagonisten. Der Substituent in der R₁-Position besitzt keine biologische Aktivität, in der Position R₃ wird eine reaktive Seitengruppe, beispielsweise eine Hydroxylgruppe, benötigt, um den Spacer an den Antagonisten zu knüpfen.

Durch die Variation der Seitenkette des Naturstoffes gelang es die Struktur - Wirkungs-Beziehung aufzuklären und den Rezeptor-Ligand zu optimieren. Die Verbindung **22** zeigte in biologischen Tests die beste Rezeptoraffinität bei gleichzeitiger hoher Selektivität.

**22**

Das Naturstoffderivat **22** wurde aufgrund seiner überlegenen Selektivität und seine im Vergleich zu den steroidalen Antagonisten einfachere Synthese als Leitstruktur ausgewählt.

Bei den theoretischen Überlegungen für die Syntheseplanung wurde von den Benzylaldehyden **23** ausgegangen, da diese kommerziell erhältlich sind. Im ersten Syntheseschritt werden diese mit Hilfe von Metallhydriden zu den Benzylalkoholen **24** reduziert. Im folgenden Reaktionsschritt erfolgt die Anknüpfung des Spacers unter Verwendung der *Williamson'schen Ethersynthese* zum Molekül **25**. Die Reaktion der Benzylalkoholen zu den Benzylbromiden **26** kann sowohl auf radikalischem als auch nucleophilen Weg erfolgen. Im nächsten Syntheseschritt erfolgt die Verknüpfung der beiden Ringe über eine nucleophile Substitution an der Seitenkette des Aromaten zur Verbindung **27**. Für die Einführung der exocyclischen Methylengruppe **28** wurde von *Haman et al* [68] das *Tebbe-Reagenz* verwendet, ein weiterer möglicher Syntheseweg wäre die *Peterson-Olefinierung*. Im letzten Schritt der Synthesereihe **29** erfolgt die Anbindung des Photosensibilisators an das nichtsteroidale Antiprogestine (Abb. 9).

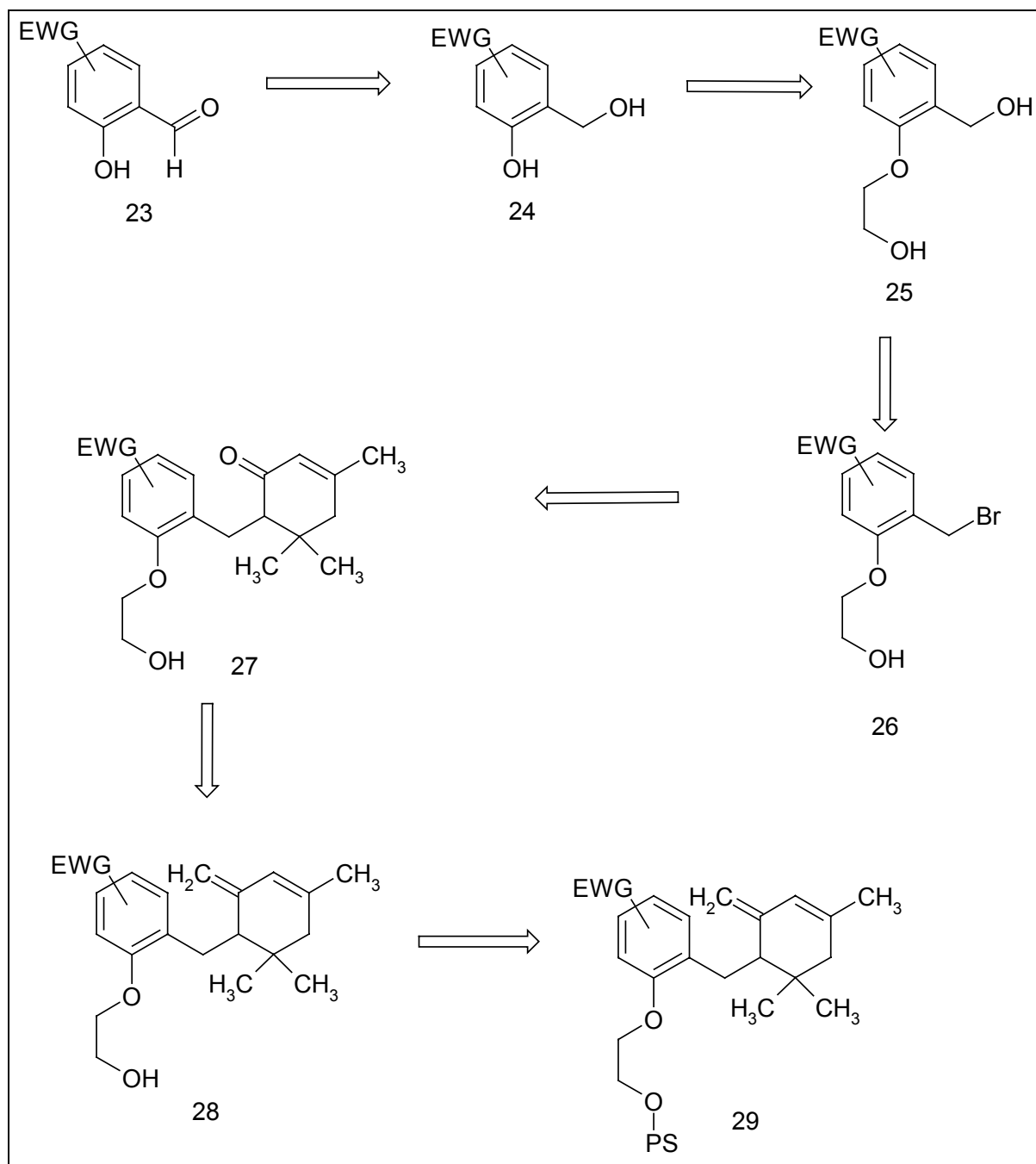


Abb. 9: Syntheseplanung für das Zielmolekül

3.1 Synthese der Benzylalkohole

Als Ausgangspunkt für die Synthesen wurden preiswerte und leicht erhältliche Hydroxy-Nitro-Benzylbromide bzw. Hydroxy-Nitro-Benzylaldehyde ausgewählt. Im ersten Syntheseschritt wurde die Schutzgruppe für die phenolischen Hydroxylgruppe eingeführt. Die verwendete Schutzgruppe muss folgende Eigenschaften besitzen: sie muss gegenüber Basen und Hydriden stabil sein, sowie unbeschadet den Angriff

von Nucleophilen überstehen. Zunächst wurde t-Butyldimethyl-silyl verwendet (Abb. 11).

Der Aromat wurde in DMF gelöst und Imidazol in katalytischen Mengen zugefügt. Die Reaktion rührte über Nacht bei RT, mit Hilfe der DC-Kontrolle konnte jedoch nur eine geringe Umsetzung festgestellt werden. Zur Freisetzung dieser Schutzgruppe wurde ein Pyridin-Flußsäure-Gemisch benötigt [70]. Aufgrund der geringen Umsetzung und des toxischen Freisetzungsreagenz wurden im Folgenden Etherverbindungen als neue Schutzgruppe untersucht.

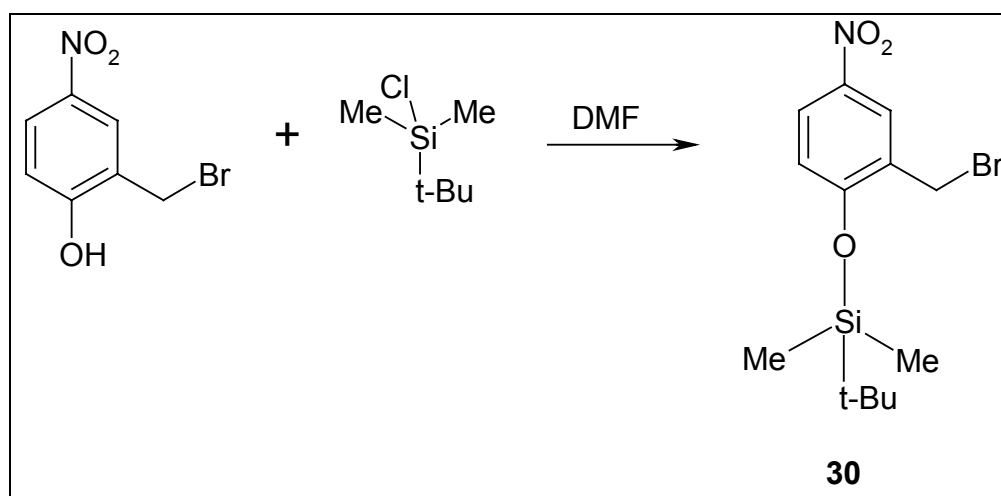


Abb. 10: Reaktionsschema zur Einführung der Schutzgruppe

Die Etherbindung besitzt die oben geforderten Eigenschaften und kann unter Säureeinwirkung wieder abgespalten werden. Dieser Ansatz ermöglichte es den gewünschten Spacer hier als Schutzgruppe einzusetzen. Allerdings müsste das freie Ende des Spacers mit einer Schutzgruppe versehen sein, da im letzten Schritt das Phototherapeutikum angeknüpft werden soll. Zur Vereinfachung und Optimierung der folgenden Reaktionsschritten wurde das freie Ende des Spacers mit einer Methoxygruppe versehen. Durch diese Gruppe war es nicht mehr möglich den Photosensibilisator mit dem Spacer zu verbinden, was zu diesem Zeitpunkt auch nicht geplant war.

Bei der Hydrierung der Aldehydfunktion zum Alkohol standen mehrere Reduktionsmitteln zur Auswahl. Dabei boten sich die Metallhydride aufgrund ihrer einfachen Handhabung an. Da Lithiumalanat ein hohes Reduktionspotential besitzt und unter Umständen die Nitrogruppe reduzieren könnte, wurde Natriumborhydrid verwendet (Abb. 12).

Die Reduktion des Aldehyds mit NaBH_4 wurde in einem 1:1 Gemisch von Methanol und THF durchgeführt. Eine Verschiebung des Mischungsverhältnisses zu protischen Lösungsmitteln, welche die Reaktion beschleunigen könnten, wurde aufgrund der geringen Löslichkeit des Aldehyden in protischen Lösungsmitteln nicht durchgeführt. Aufgrund dessen wurde die Reaktion zumeist über Nacht, aber mindestens 4 h bei RT durchgeführt.

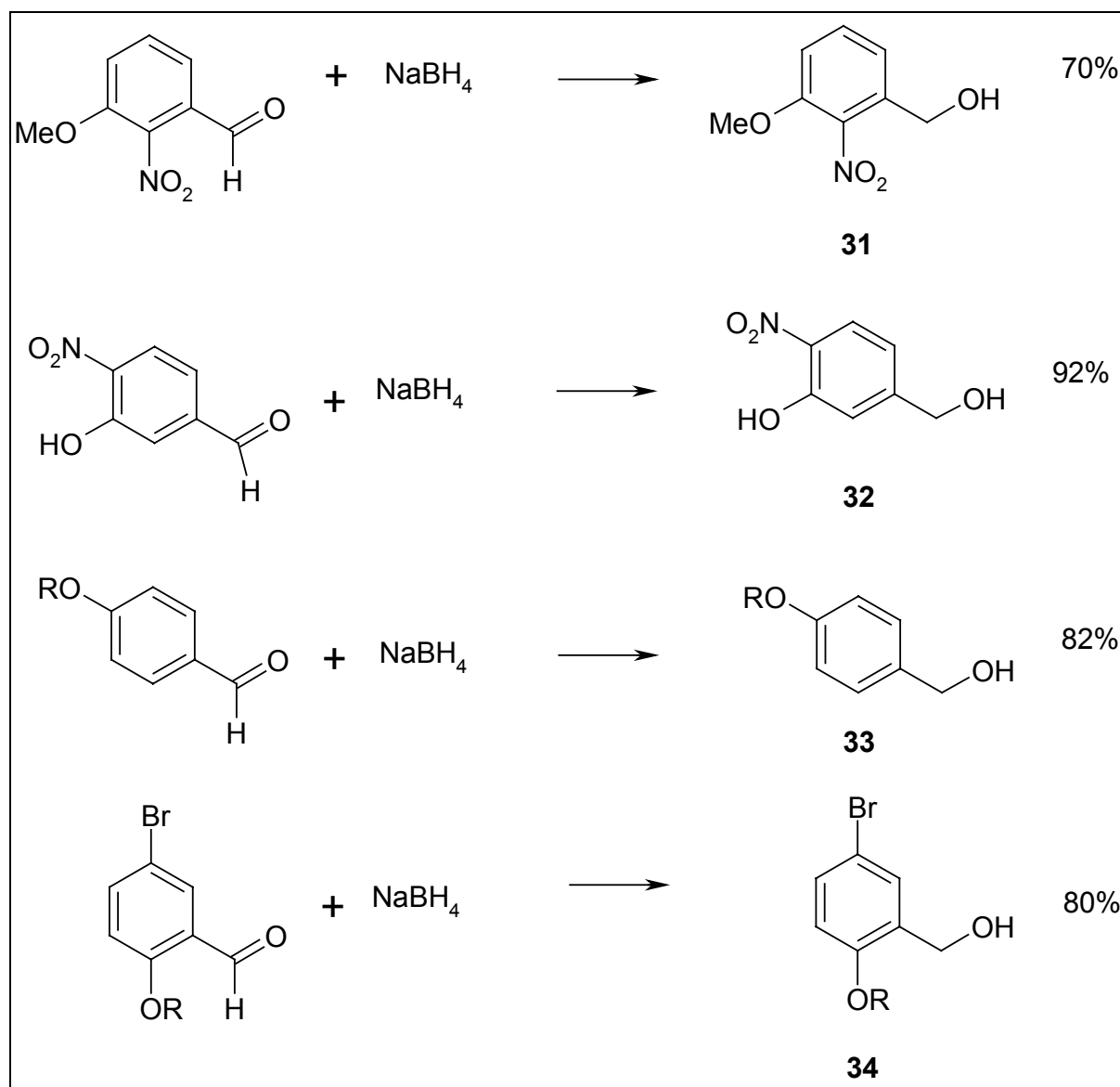


Abb 12: Ausbeuten bei der Reduktion ausgewählter Verbindungen

Die Ausbeuten der Synthese hingen in einem gewissen Maß von der Stellung der anderen Substituenten am Aromat ab. Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn die anderen Substituenten in para- und meta-Position bezüglich der Aldehydgruppe standen.

3.2. Einführung des Spacers

Die Einführung der Spacergruppe in das Molekül kann sowohl auf der Aldehyd- als auch auf der Benzylalkohol-Stufe erfolgen. Auf der Ebene des Benzylalkohols ermöglicht die unterschiedliche Säurestärke der phenolischen bzw. benzylichen Hydroxylgruppe die regioselektive Reaktion.

Bei dieser S_N2 Reaktion wird die phenolische Hydroxylgruppe durch eine Base, beispielsweise K_2CO_3 , deprotoniert. Im zweiten Reaktionsschritt greift das Nucleophil das positiv polarisierte Kohlenstoffatom des Spacers an.

Die ersten Versuche zur Einführung des Spacers wurden mit 2-Chloro-2-methoxyethylether durchgeführt.

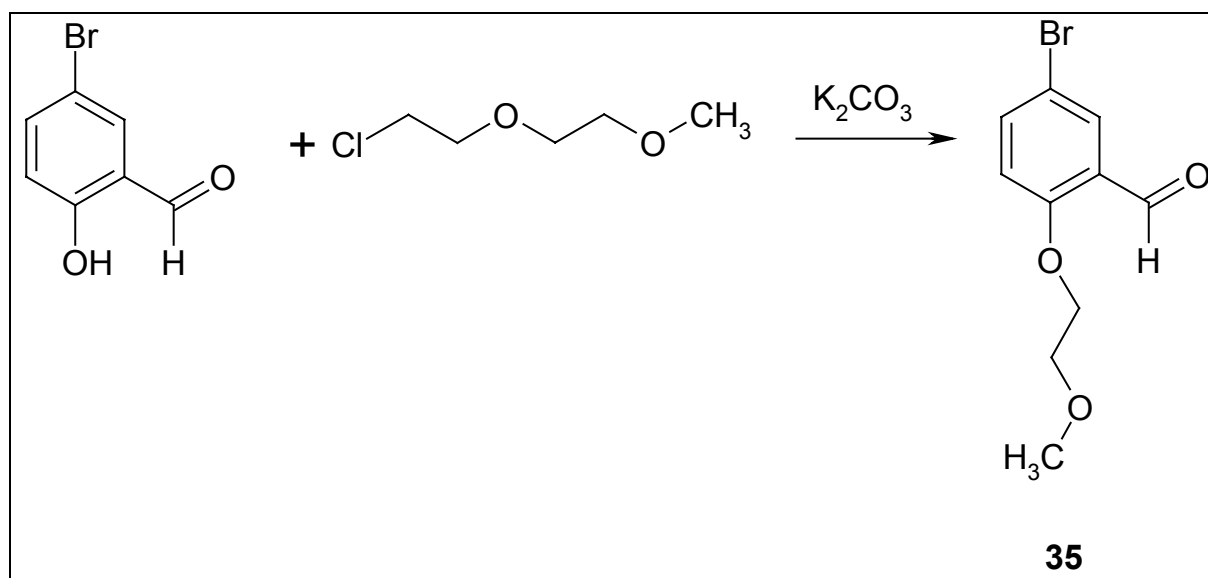


Abb. 13: Reaktionsschema zur Einführung des monofunktionalen Spacers

An diesen Spacer ist es nicht möglich das gewünschte Porphyrin anzuknüpfen, aber mit diesen Versuchen wurden die Auswirkungen sterisch anspruchsvollen Spacer auf diese und die folgenden Reaktionen untersucht. Im zweiten Abschnitt wurde ein bifunktionaler Spacer eingesetzt. Bei diesen bifunktionalen Spacer muss die Verknüpfungsstelle für das Porphyrin geschützt sein, während die zweite funktionelle Gruppe eine gute Abgangsgruppe enthält. Diese Fragestellung wurde von Doris Oehler in ihrer Diplomarbeit ebenfalls untersucht.

Eine funktionelle Gruppe des Diols wurde zunächst in eine Tosylgruppe überführt.

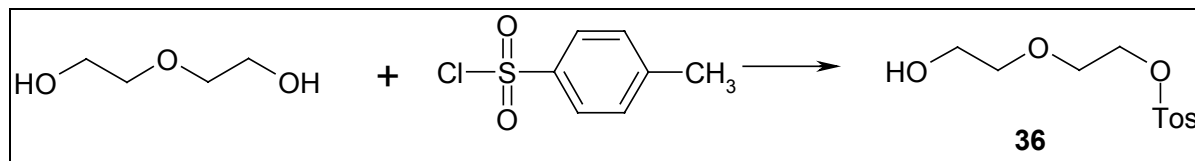


Abb. 14: Reaktionsschema zur Bildung des Tosyl-Spacers

Die zweite Hydroxylgruppe wurde in einer S_N2 -Reaktion mit einer Acetylgruppe geschützt.

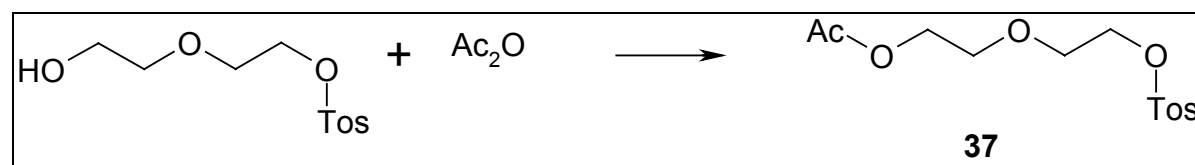


Abb. 15: Reaktionsschema zur Acetylierung des Spacers

Die im ersten Schritt eingeführte Tosylgruppe wurde in einer *Finkelstein* ähnlichen Reaktion durch eine Iodid-Gruppe ersetzt, welche eine deutlich bessere Abgangsgruppe darstellt.

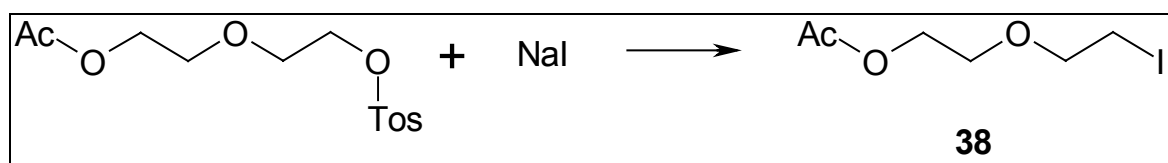


Abb. 16: *Finkelstein*-Reaktion

Im letzten Schritt erfolgte die Verknüpfung des Spacers mit dem Cyclocymopolderivats durch eine nucleophile Substitutions-Reaktion.

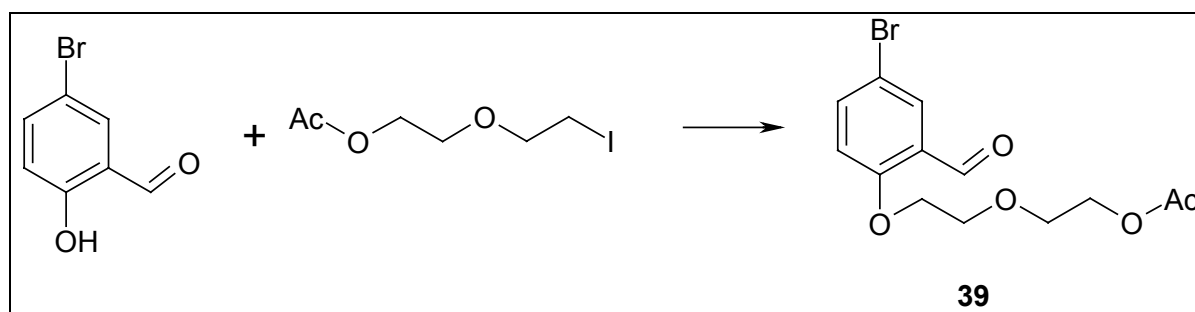


Abb. 17: Einführung des bifunktionalen Spacers

3.3 Synthese der Benzylbromide

Für die Einführung des Bromatoms als Substituent der Seitenkette des Aromates stehen einige Möglichkeiten offen. Eine Variante der Bromierung wäre die radikalische Substitution eines geeigneten Toluolderivats (*Abb. 18*). Diese Reaktion wurde in einer Diplomarbeit näher untersucht [71]. Trotz sehr zeit- und arbeitsaufwendiger Reaktionsbedingungen, konnte das gewünschte Produkt nur in mäßigen Ausbeuten erhalten werden.

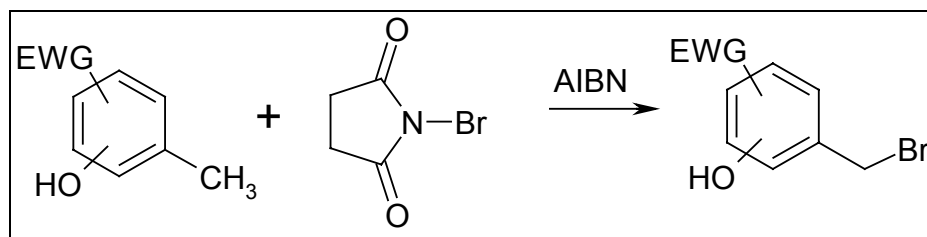


Abb. 18: Reaktionsschema zur radikalischen Substitution

Eine weitere Möglichkeit ist die Umsetzung des Benzylalkohols mit Halogenwasserstoffen oder Phosphorhalogeniden. Die nucleophile Substitution der Hydroxylgruppe durch ein Bromid verläuft bei Benzylalkoholen nach einem S_N1 Mechanismus (*Abb. 19*). Die Reaktion verläuft dadurch in protischen Lösungsmitteln schneller ab als in aprotischen. Ein Lösungsmittelwechsel zu protischen Lösungsmitteln könnte aber die Etherspaltungen am Spacer fördern.

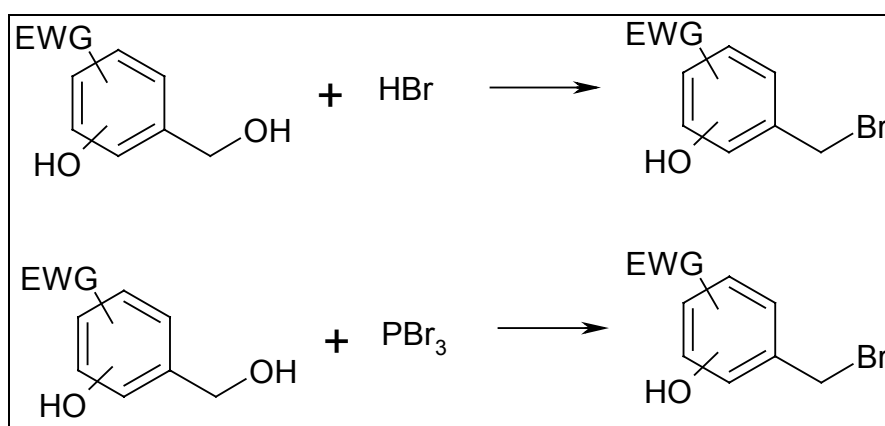


Abb. 19: Reaktionsschema zur Bromierung der Alkoholfunktion

Bei der *Appel-Reaktion* handelt es sich um eine elegante Möglichkeit, einen Alkohol zu halogenieren [72]. Bei dieser Reaktion verwendet man das Zweikomponentensystem Phosphan / Tetrachlorkohlenstoff. Es wird vermutet, dass der Mechanismus über eine ionische Zwischenstufe verläuft, da sowohl UV-Bestrahlung als auch die Zugabe von Radikalfängern keinen Einfluss auf den Reaktionsverlauf besitzen (*Abb.*

20). Die Reaktion wird durch die polarisierende Wirkung des permanenten Dipols Phosphan auf das leicht polarisierbare Tetrahalogenmethan eingeleitet.

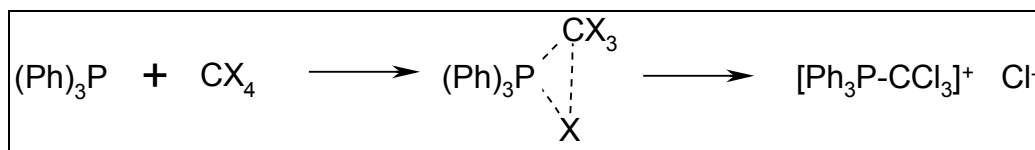


Abb. 20: Aktivierung des Phosphans

Mit Alkoholen reagieren Triphenylphosphan und Tetrachlorkohlenstoff zu einem Salz und Chloroform (Abb. 21).

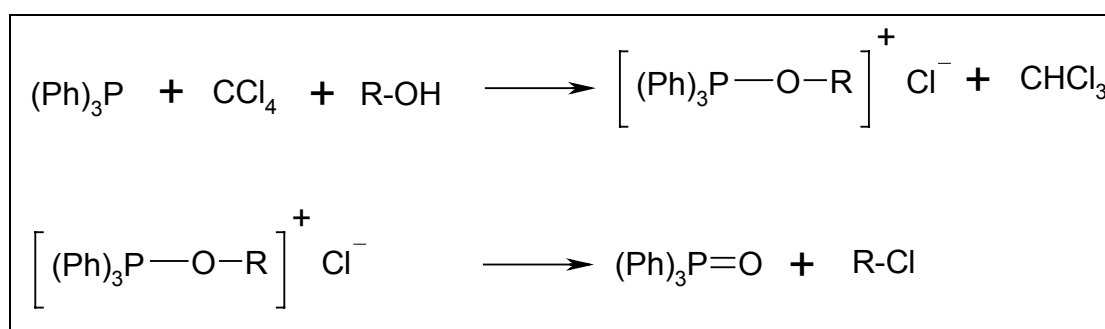


Abb. 21: Bromierung analog der Appel-Reaktion

Die Phosphoniumchloride zerfallen in einer raschen *Arbuzow-Umlagerung* zu Phosphanoxid und Alkylchloriden.

Es ist möglich diese *Appel-Reaktion* zu variieren, indem man Tetrabrommethan verwendet. Der Reaktionsmechanismus entspricht den oben gemachten Aussagen bezüglich Tetrachlorkohlenstoff. Diese Umsetzung ist daher eine wirksame Methode, um unter sehr milden Bedingungen Alkoholen in Alkylbromide zu überführen (Abb. 22).

Die Versuche wurden in Dichlormethan durchgeführt und nach Zugabe des Tetrabromkohlenstoffs wurde die Reaktion über Nacht bei RT gerührt. Die Ausbeuten unterschieden sich zum Teil deutlich, eine Abhängigkeit vom Substitutionsmuster konnte allerdings nicht erkannt werden.

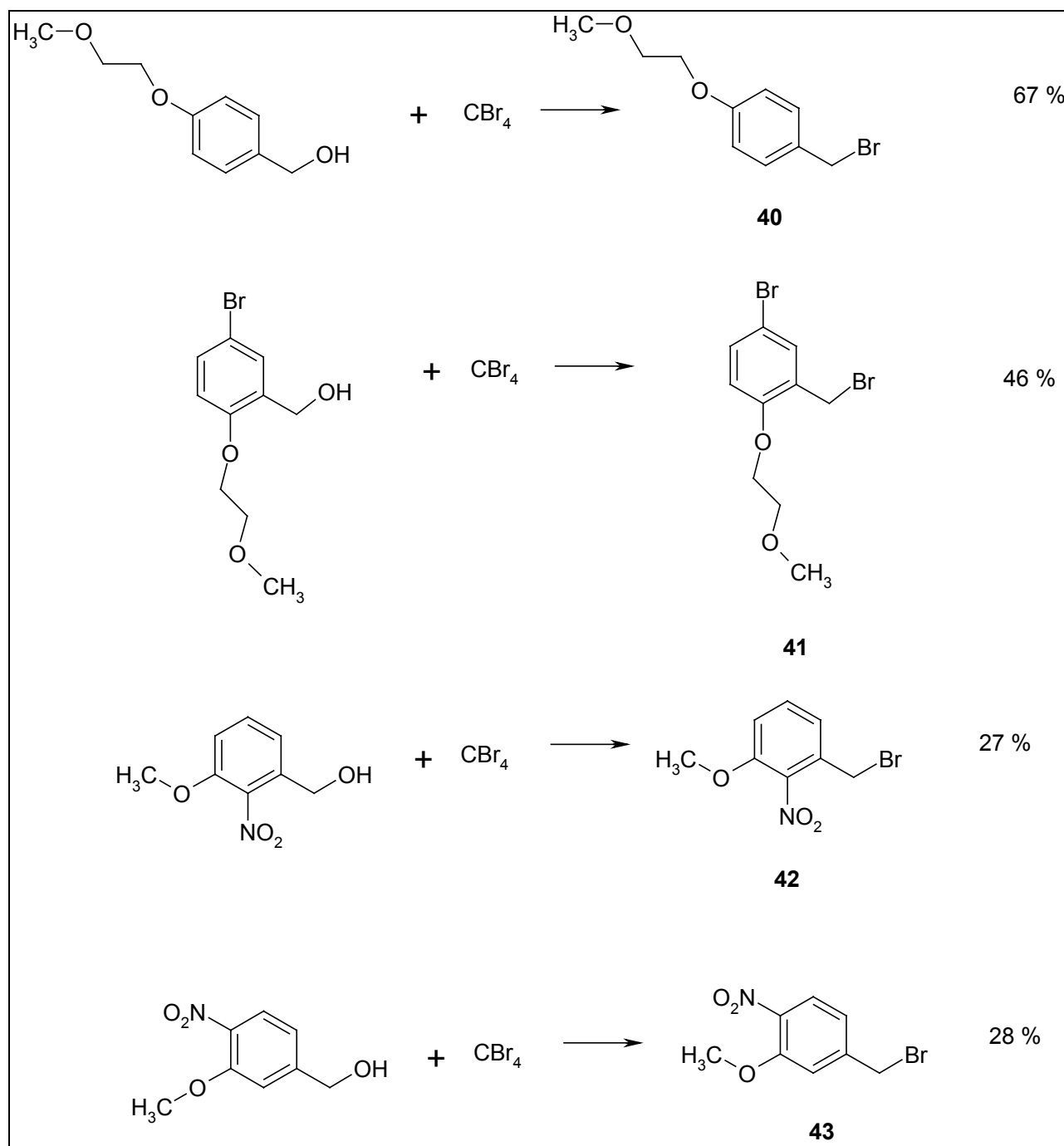


Abb. 22: Ausbeuten der Bromierungs-Reaktion bei ausgesuchten Verbindungen.

3.4 Aufbau des Cyclocymopolderivat

Die Verknüpfung der beiden Ringe erfolgt durch eine nucleophilen Substitution am benzylicchen C-Atom. Zunächst wurde in situ Lithiumdiisopropylamid (LDA) erzeugt und Isophoron bei -78°C zugetropft. Die folgende regioselektive Deprotonierung des Isophorons an Position 6 wurde durch die benachbarte Carbonylgruppe ermöglicht

(Abb. 23). Die hohe Elektroaffinität des Sauerstoffes erleichtert eine bessere Delokalisierung der negativen Ladung des entstandenen Carbanions.

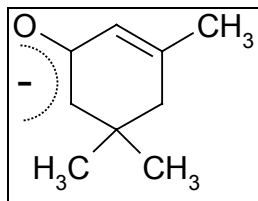


Abb. 23: Verteilung der negativen Ladung des Carbanions

Das Carbanion führt einen nucleophilen Angriff auf das positiv polarisierte Benzylatom aus. Im Lauf der Reaktion wird die Brückenverbindung und Lithiumbromid gebildet (Abb. 24).

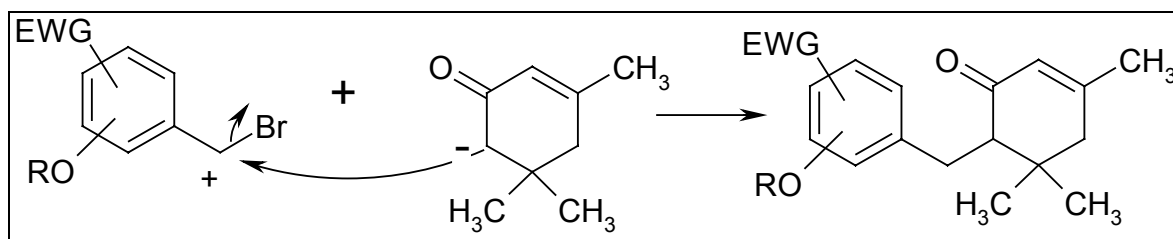


Abb. 24: Kopplung der beiden Ringe

Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit für die Deprotonierung von 15 min auf 20 min, konnte die Ausbeute um 30% gesteigert werden (Abb. 25) [69].

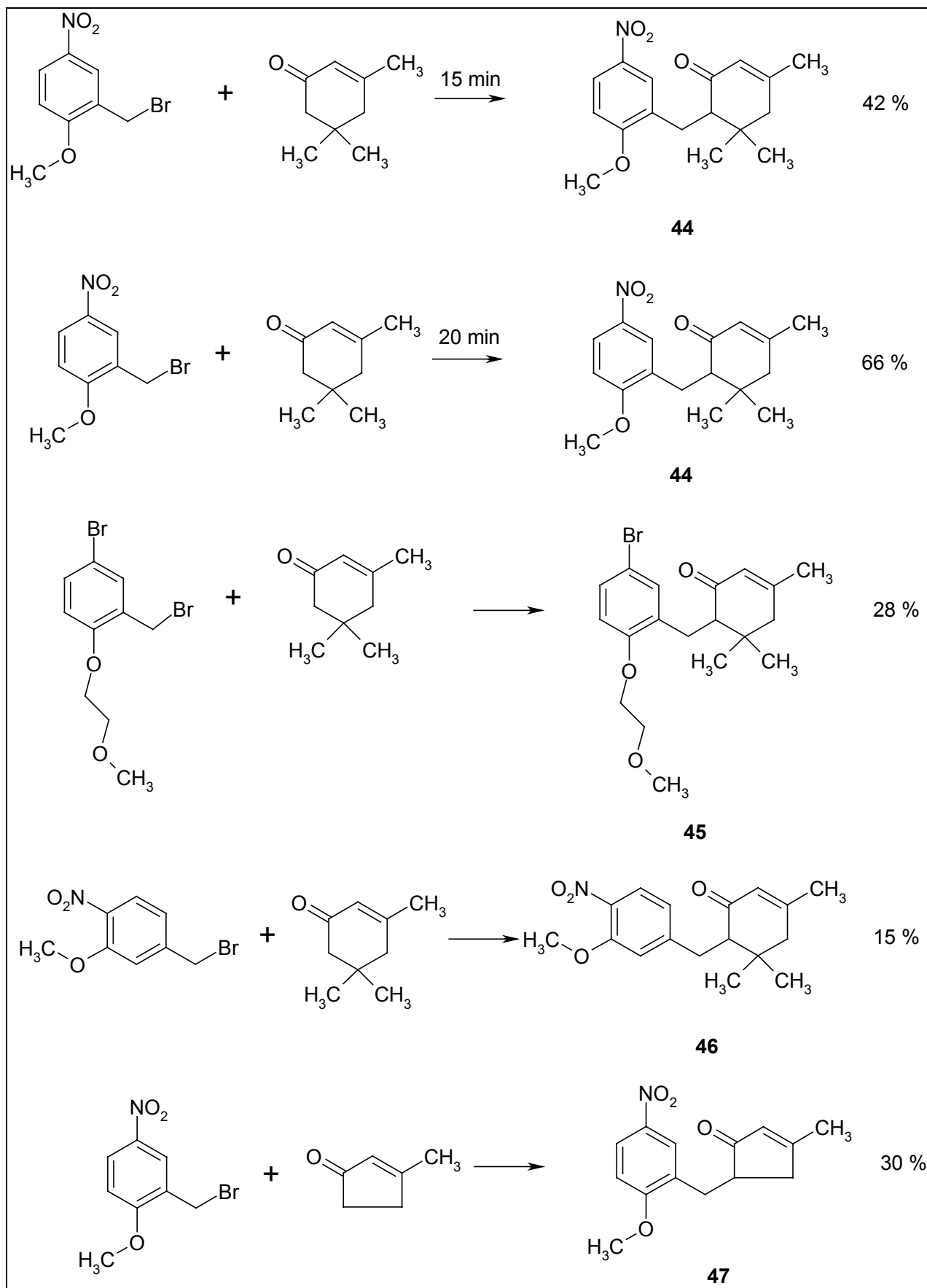


Abb. 25: Ausbeuten bei der Kopplung der beiden Ringe

In einem weiteren Experiment wurde die Verknüpfung der beiden Ringe mit Acetyl-Ethoxy-Ehtyl-Spacer untersucht. Bei dieser Synthese konnte allerdings kein Produkt gewonnen werden. Der einzige Unterschied zu den anderen Verknüpfungsreaktion bestand in dem Ester am Ende des Spacers. Eine basische Verseifung des Esters kann ausgeschlossen werden, da keinerlei protische Verbindungen im Reaktionsansatz vorlagen.

3.5 Carbonylolefinierung

Als ein Schlüsselschritt bei der Synthese der Cyclocymopolderivate erwies sich die Einführung der exocyclischen Methylengruppe am Isophoronring.

Für diese Reaktion stehen prinzipiell mehrere mögliche Reagenzien zur Verfügung. In früheren Untersuchungen zur Herstellung dieser mariner Naturstoffe wurde das *Tebbe-Reagenz* eingesetzt (Abb. 26). Bei diesem Molekül handelt es sich um eine Titan-Aluminium Verbindung, welche durch zwei Cyclopentadien-Ringe komplexiert wird.

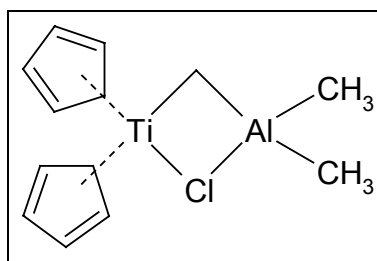


Abb. 26: *Tebbe-Reagenz*

Diese Organo-Metall-Verbindung wurde speziell für die funktionelle Umwandlung einer Carbonylgruppe in eine Methylengruppe entwickelt [73].

Zur Einführung der exocyclischen Methylengruppe in das Isophoronderivat **44** wurde deshalb zunächst das *Tebbe-Reagenz* zur Anwendung gebracht [69]. Bei der DC-Kontrolle des Reaktionsverlaufs wurde nach 4 Stunden keine Umsetzung festgestellt werden, weshalb die Reaktionszeit auf 24 h ausgedehnt wurde. Diese Maßnahme führte nicht zu dem gewünschten Erfolg, weiterhin wurde keine Umsetzung beobachtet.

In einem Kontrollexperiment wurde nur Isophoron unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen umgesetzt [69]. Bereits nach 4 h konnte bei dieser Reaktion das olefinierte Produkt durch eine Dünnschicht-Chromatographie nachgewiesen werden (Abb. 27).

Der nicht erfolgreiche Einsatz des *Tebbe-Reagenz* bei der Olefinierung des substituierten Cyclocymopolderivats kann mit der sterischen Abschirmung der Carbonylgruppe durch den sperrigen Arylrest erklärt werden.

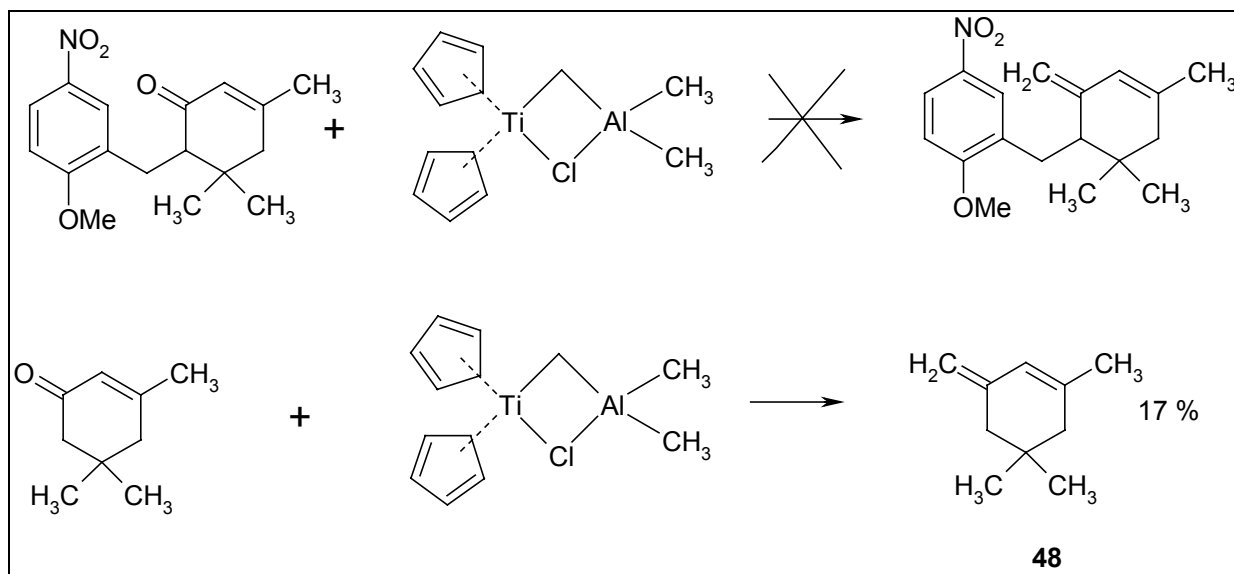


Abb. 27: Reaktionsschema des *Tebbe-Reagenz*

Vor diesem Hintergrund wurde nach weiteren Möglichkeiten zur Olefinierung dieser Produkte gesucht. (Abb. 28).

Von [74] wird ein Verfahren zur Carbonylolefinierung von Ketonen beschrieben, bei dem Titantetrachlorid, elementares Zink und Methyljodid, ähnlich der *Simmons-Smith-Reaktion*, zum Einsatz kommen. Die in der Literatur beschriebenen Reaktionsbedingungen wurden auf das Molekül **44** angewandt.

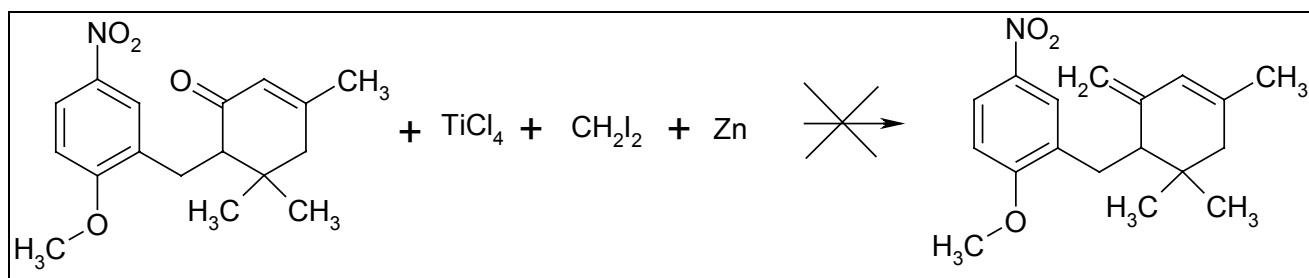


Abb. 28: Reaktionsschema der Methylenierung der Carbonylgruppe

Die Lewis-Säure Titantetrachlorid aktiviert die Carbonylgruppe, die Polarisierung der Carbonylbindung wird verstärkt und ermöglicht, dass das Sauerstoffatom als Abgangsgruppe fungieren kann.

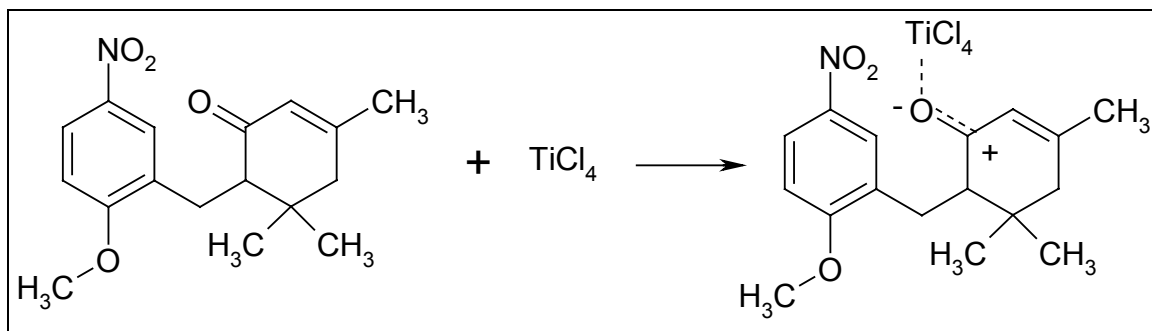


Abb. 29: Aktivierung der Carbonylgruppe durch eine Lewis-Säure

Das in situ gebildete Zinkcarbonide kann das positiv polarisierte Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe angreifen.

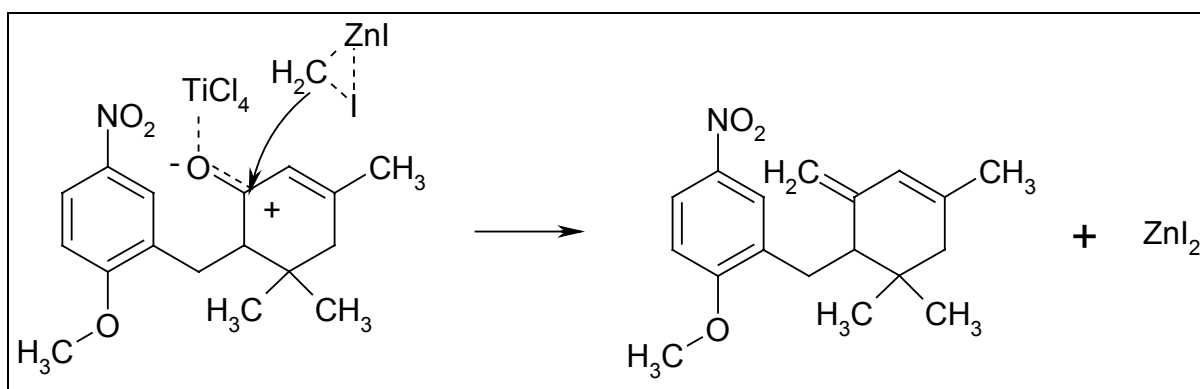


Abb. 30: Bildung der exocyclischen Methylengruppe

Unter den zitierten Reaktionsbedingungen konnte zunächst keine Produkt isoliert werden. Trotz vielfältiger Variierung der Reaktionsbedingungen konnte auch in späteren Experimenten keine Umsetzung beobachtet werden.

Auch beim Einsatz von Trimethyl-aluminium als Lewis-Säure führte zu keiner nennenswerten Umsetzung des Eduktes (Abb. 29), weshalb in weiterer Folge die *Peter-son-Olefinierung* für die Einführung der exocyclischen Methylengruppe ins Auge gefasst wurde.

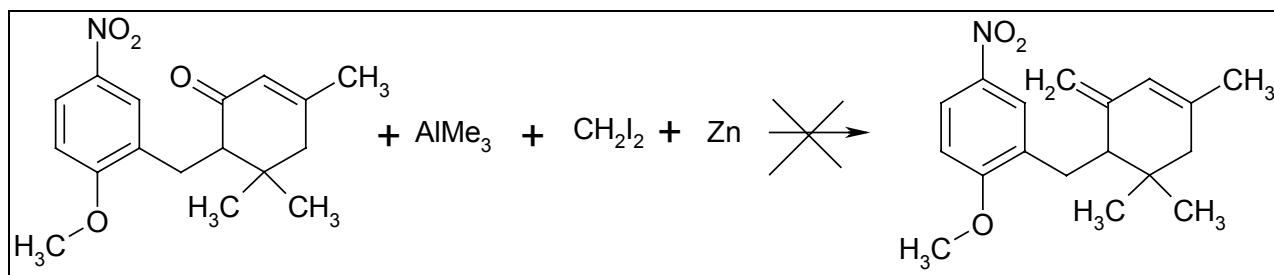


Abb. 31: Reaktionsschema für Trimethyl-aluminium

Die *Peterson-Reaktion* verläuft in zwei Schritten (Abb. 30). Zunächst reagiert ein Silyl-Carbanion mit einer Carbonylgruppe zu dem Lithiumsalz des β -Hydroxysilan. In einer anschließenden β -Eliminierung wird das β -Hydroxysilan unter Abspaltung von Trimethylsilanol in das Olefin überführt [76].

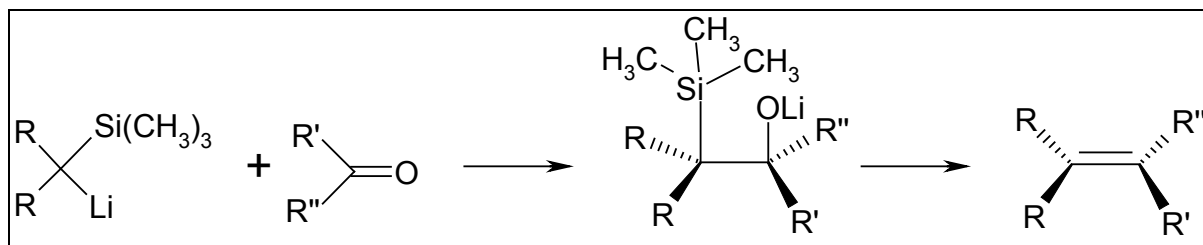


Abb. 32: Reaktionsschema für die *Peterson-Olefinierung*

Das Naturstoffderivat **44** wurde bei -78°C mit Trimethylsilyl-Methylolithium umgesetzt und langsam auf RT erwärmt. Nach der Aufarbeitung zeigten spektroskopische Untersuchungen, dass das gewünschte β -Hydroxysilan erhalten wurde. Die Zugabe eines HF/Pyridin Gemisches zur Abspaltung des Trimethylsilanols unter Bildung des Olefins führte nicht zu den gewünschten Produkt, vielmehr wurde das Silylderivat **49** isoliert, bei dem der aromatische Ring in ortho-Position zur Nitro-Gruppe methyliert vorliegt. Ein ähnliches Methylderivat wurde bereits früher im Zuge der Synthese des Cyclocymopolderviats in der Literatur beschrieben. Trotz Variation der Reaktionsbedingungen gelang es nicht mit Hilfe der *Peterson-Olefinierung* das gewünschte Produkt zu erhalten.

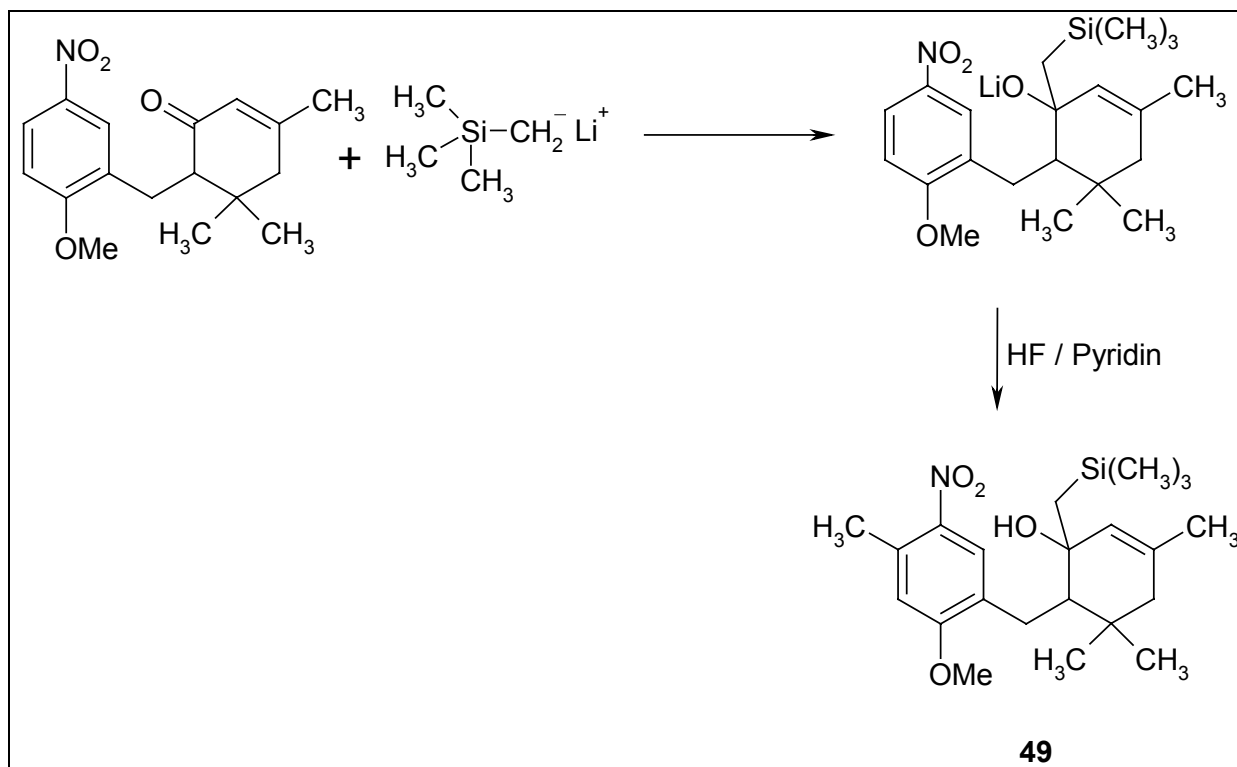


Abb. 33: Peterson-Olefinierung mit dem Naturstoff-Derivat

Die *Horner-Emmons-Reaktion* [77] ermöglicht ebenfalls die Einführung einer exocyclischen Methylengruppe. Dieser Syntheseweg ist mit der *Wittig-Reaktion* verwandt. Die *Wittig-Reaktion* wurde hier nicht angewendet, da das Ylid durch drei Phenylringe stabilisiert wird. Aufgrund dieser sterisch anspruchsvollen Liganden erschien eine erfolgreiche Synthese unwahrscheinlich.

Bei der *Horner-Emmons-Reaktion* werden Phosphonate in Gegenwart von starken Basen mit Carbonylverbindungen umgesetzt. Dabei wird das Phosphonat zunächst zum Phosphonat- α -carbanion deprotoniert, dieses addiert als Nucleophil an die Carbonylgruppe und reagiert unter Eliminierung von Dialkylphosphat zum Olefin ab.

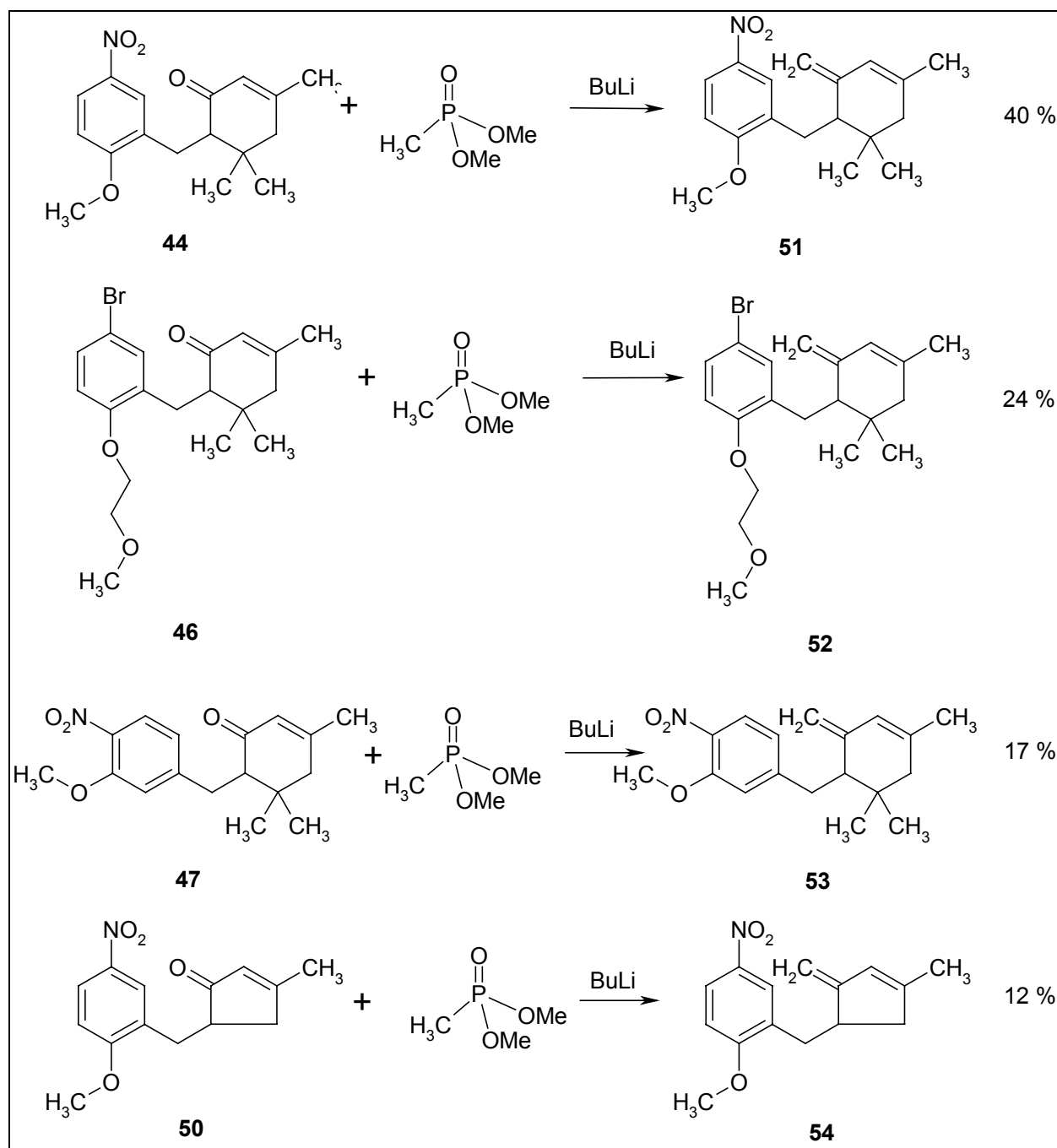


Abb. 34: Syntheseausbeuten für die Einführung der exocyclischen Methylengruppe

Zunächst wurde diese Reaktion mit dem 2-Methoxy-5-Nitro-Derivat untersucht. Die dünnschicht-chromatographische Kontrolle des Reaktionsverlaufs ergab, dass das gewünschte Zielmolekül bereits nach 2 Stunden in isolierbaren Mengen beobachtet wurde. Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes führte zur Isolierung des gewünschten Cyclocymopolderivates mit einer Ausbeute von 40%.

Auch die Carbonylverbindungen **46**, **47** und **50** konnten mit dieser Methode zu den gewünschten Alkenen umgesetzt werden. Wobei sich jedoch das Cyclopentenderi-

vat **54** nicht als stabil erwies. Bereits nach wenigen Tagen wurde bei diesem Produkt Zersetzung beobachtet.

In Folge von anschließenden spektroskopischen Untersuchungen wurde vermutet, dass eine Umlagerung der exocyclischen Doppelbindung zu einem Cyclopentadien-Derivat stattfand. Die drei anderen Naturstoffderivate erwiesen sich hingegen als stabil.

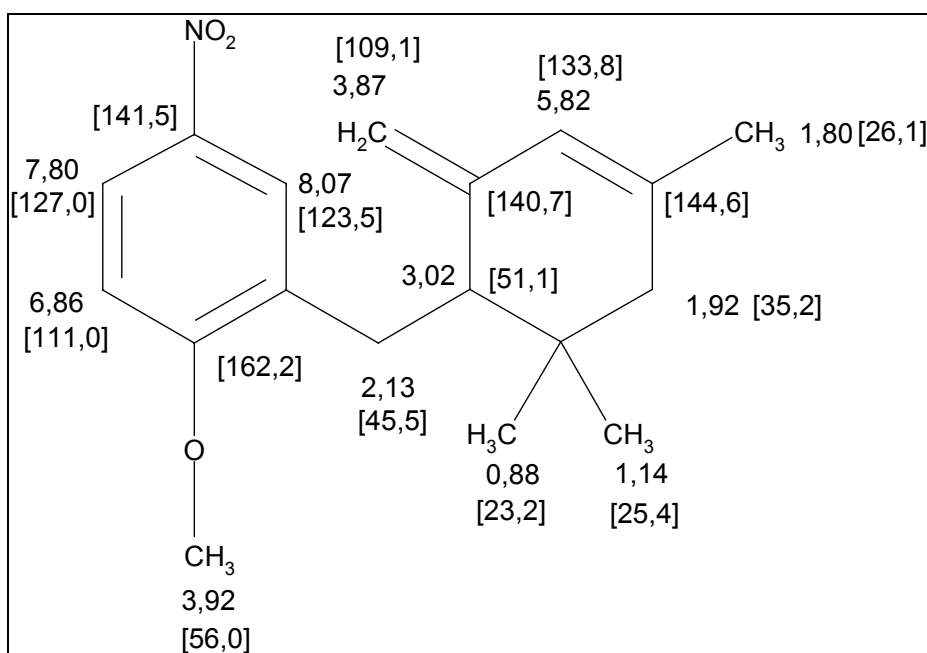


Abb. 35: NMR-Daten von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-cyclohex-3-enyl-methyl)benzen

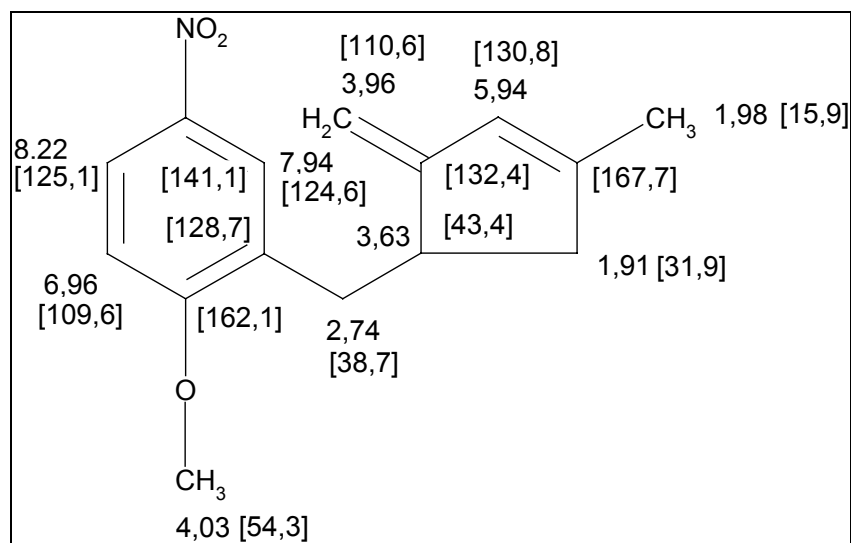


Abb. 36: NMR-Daten von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4-methyl-2-methylen-cyclopent-3-enyl-methyl)benzen. Die ¹³C-NMR Daten wurden berechnet.

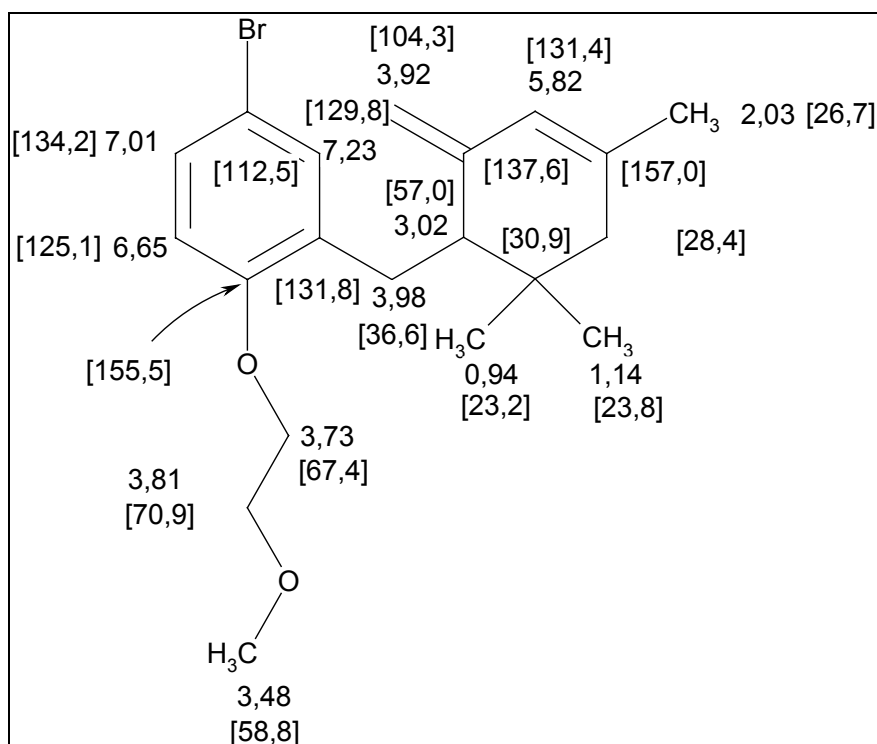


Abb. 37: NMR-Daten von 2-(2'-Methoxy-ethylether)-5-brom-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylencyclohex-3-en-methyl)benzen

4. Zusammenfassung

In den letzten Jahren gewann die Photodynamische Therapie deutlich an Bedeutung bei der Behandlung von Neoplasien. Für die nächsten Jahren werden weitere Zulassungen für neue Indikationen erwartet.

Diese Neuzulassungen werden einerseits durch neue Photosensibilisatoren und andererseits durch neue Ansätze beim Drug Targeting ermöglicht. Zur Zeit wird der Ansatz forciert, die Sensibilisatoren an einen tumorspezifischen Antikörper zu knüpfen. Eine weitere Möglichkeit für das Drug Targeting besteht darin, den Photosensibilisator an tumorspezifische Rezeptorliganden zu binden.

In der vorliegenden Dissertation wird der Versuch einer Kopplung eines Photosensibilisators über einen Spacer an ein nicht steroidales Antiprogestin erarbeitet. Der Progesteron-Rezeptor wurde als Target ausgewählt, da zahlreiche Tumorarten, wie beispielsweise das Mammakarzinom, den Progesteron-Rezeptor überexprimieren.

Als Leitstruktur für die Synthese der Antiprogestine wurde ein mariner Naturstoff ausgewählt. Das Cyclocymopol-Derivat besitzt den Vorteil einer im Vergleich zu Mifepriston verbesserten Selektivität für den Progesteron-Rezeptor und eines einfacheren synthetischen Zugangs.

Für die Erstellung einer Bibliothek von Progesteron-Antagonisten, die auf den Cyclocymopol-Derivaten aufbauen, sind hinsichtlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwei Merkmale zu beachten. Der aromatische Ring muss eine elektronenziehende Gruppe, der aliphatische Ring eine exocyclische Methylengruppe aufweisen, da diese Gruppen essentiell für die Rezeptorbindung sind.

Bei der Synthese des Progesteron-Antagonisten wird zunächst ein Benzaldehyd-Derivat mit dem gewünschten Spacer verknüpft, der in der Folge mit dem Phototherapeutikum verknüpft werden kann. Im nächsten Schritt wird die Aldehydfunktion mit Natriumborhydrid zur Alkoholfunktion reduziert. Die so erhaltenen Alkohole werden anschließend mit Hilfe einer *Appel*-artigen Reaktion in das Bromid überführt. Die Benzylbromide wurden mit Isophoron und Butyllithium zu dem Naturstoff-Analoga umgesetzt. Durch Variieren der Reaktionsbedingungen konnten die aus der Literatur bekannten Ausbeuten erhöht werden. Für die Einführung der exocyclischen Methylengruppe in die Naturstoff-Derivate mussten zunächst verschiedene Synthesemethoden untersucht werden. In der Literatur wurde für diesen Synthesewege bisher

das *Tebbe* Reagenz eingesetzt, welches bei den hier eingesetzten Edukten zu keiner Reaktion führte. Es kann vermutet werden, dass die sterische Hinderung durch den Spacer die Umsetzung blockiert.

In weiteren Experimenten wurde versucht, über eine *Simmons-Smith*-ähnliche Reaktion die gewünschte Funktionalität zu erhalten. Da auch bei dieser Reaktion das gewünschte Produkt nicht erhalten werden konnte, wurde in weiteren Ansätzen die *Peterson-Olefinierung* ausgewählt. Mit dieser Methode gelang es schließlich, geringe Mengen des gewünschten Produktes herzustellen. Als Nebenreaktion kam es dabei jedoch zu einer Methylierung des aromatischen Rings.

Durch Anwendung der *Horner-Emmons-Reaktion* konnte schließlich das Antiprogesterin in ausreichender Menge und Reinheit erhalten werden.

Es war jedoch nicht möglich, das in Abb. 7 erläuterte Zielmolekül aus dem Photosensibilisator, Spacer und Antiprogesterin darzustellen.

4.1 Summary

In the last few years the importance of the Photodynamic Therapy grew significantly. In the European Union the PDT obtained the approval for early lung cancer and age related macular degeneration, but the approvals for more diseases are expected.

These new approvals are possible through the latest photosensitizer and new approaches in drug targeting.

In this thesis the synthesis of a photosensitizer linked via a spacer to an antiprogesterone was researched. The progesterone-receptor was selected for the drug-targeting, because many cancers, for example the Mamma carcinoma, overexpressed the progesterone-receptor.

As the lead structure for the synthesis of some antiprogesterones a non-steroidal compound was selected. These cyclocyclopentylmonoethyl-ether derivatives had the advantages of a better selectivity for the progesterone-receptor and a simple synthesis in comparison with mifepristone. The starting compound of this synthesis was a benzyl aldehyde, which was combined with the spacer. This reaction proceeded in protic solvents, like DMF, in good yields. The next step was the reduction of the aldehyde function with NaBH_4 to an alcohol, with good yields. The synthesis was accomplished with the Appel-like reaction preparing the benzyl bromide. The formation of the bromide reached only moderate yields. At the following step isophorone was deprotonated with butyllithium. The lithium enolate was trapped with benzyl bromide to provide the precursor of the antiprogesterone. The reaction gave the desired product in good yields.

The last reaction was the key reaction in the access of the antiprogesterones. In the first experiments the Tebbe reagent was used as the methylenation compound. This reaction failed to give the desired product. In the next step a *Simmons-Smith*-like reaction was examined for the preparation of the antiprogesterone, but also no product was obtained. In a third experiment with the *Peterson-Methylenation* the desired product was obtained in very low yield. These products had an additional methyl group at the aromatic cycle of the molecule.

The use of the *Horner-Emmons-reaction* was required to prepare the antiprogesterone in adequate yield. In comparison with the literature yield (9%), the obtained yields (max. 40%) were good.

5. Ausblick

Die Photodynamische Therapie steht erst am Anfang ihrer Entwicklung, wie sich am großen Forschungsinteresse erkennen lässt [78]. Die Forschung konzentriert sich dabei auf die Entwicklung neuer Photosensibilisatoren und einer Verbesserung des Drug Targetings. Beim Drug Targeting stehen vor allem die monoklonalen Antikörper im Blickpunkt der Forscher [41], aber es werden auch Rezeptorliganden eingesetzt [47].

Die Ergebnisse der ersten Experimente mit dem Östrogen-Rezeptor als Ziel für das Drug Targeting waren enttäuschend in Bezug auf die Rezeptoraffinität. Das Phototherapeutikum mit dem Rezeptorliganden besaß zwar eine um den Faktor 100 geringere Affinität, trotzdem konnte eine verbesserte Tumorselektivität im Vergleich zu den reinen Photosensibilisatoren festgestellt werden.

Nach der erfolgreichen Synthese des nichtsteroidalen Progesteron-Antagonisten steht nun die Anknüpfung eines geeigneten Spacers im Mittelpunkt der Entwicklung. In den ersten Versuchen von *D. Oehler* zeigte sich, dass die Bedingungen an die Schutzgruppe des Spacers komplex sind. Da der Spacer in einem frühen Stadium der Synthese eingefügt wird, sollte er inert gegenüber der Hydrierung, Bromierung und der *Horner-Emmons-Reaktion* sein, aber auch die Anknüpfung des photosensiblen Molekülteils erlauben. Die nachfolgende Enantiomerentrennung ist für die biologische Testung des Produktes unerlässlich. Nach erfolgreicher Testung könnte die Ankopplung des phototherapeutischen Teils erfolgen. Mit diesem Schritt wäre es vielleicht möglich eine selektivere Bekämpfung von Krebs mit Hilfe der Photodynamische Therapie zu erhalten.

6. Experimenteller Teil

6.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Aldrich und Merck, Darmstadt bezogen. Deuterierte Lösungsmittel wurden bei der Firma Deutero GmbH erworben.

Tetrahydrofuran (THF) wurde über Molekularsieb vorgetrocknet und über Natrium mit Benzophenon als Indikator bis zur intensiven Blaufärbung erhitzt und anschließend destilliert. Dichlormethan (DCM) wurde über Calciumchlorid vorgetrocknet und mit Molekularsieb 0,3 A absolutiert. Methanol wurde über Natriumcarbonat vorge- trocknet und über Molekularsieb 0,3 A wasserfrei erhalten.

6.1.2 Chromatographie

Die Reaktionskontrolle wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Kiesel- gel-60-Alufolie mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄ der Firma Merck durchgeführt. Die Sub- stanzen detektierte man in einer UV-Kammer der Firma Heraeus bei einer Wellen- länge von 254 nm. Die präparative Säulenchromatographie erfolgt mit dem Kieselgel 60 der Firma Merck, Korngröße 0,040-0,063 mm und 230-300 mesh. Die Lösungs- mitteln wurden vor dem Einsatz als Eluens destilliert.

6.1.3 Kernresonanzspektroskopie

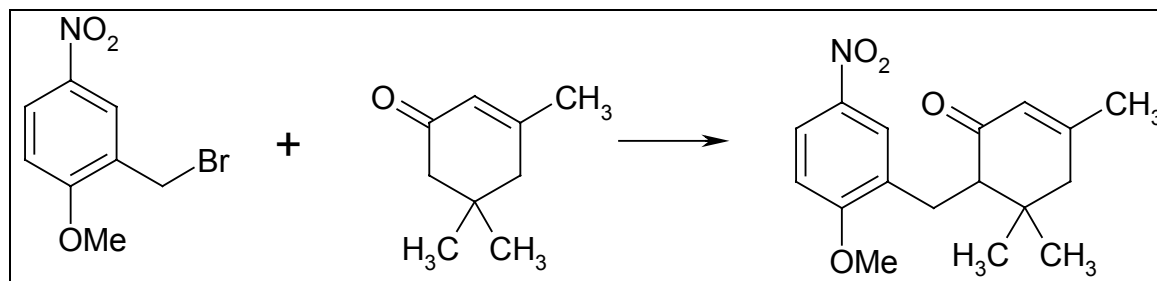
Für die Messung der NMR-Spektren wurden folgende Modelle der Firma Bruker ver- wendet: AC 200E (5 mm Dual Probenkopf), ARX 300 (5 mm Invers Probenkopf) und AMX 500 (5 mm TXI Probenkopf). Die chemische Verschiebung der Signal sind in parts per million (ppm) und die Kopplungskonstanten in Hertz angegeben. Für die Beschreibung der Aufspaltungsmuster verwendete man folgende Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multiplett.

6.1.4 Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem MAT 212 Massenspektrometer der Firma Finnigan aufgenommen. Als Ionisationsmethode verwendete man den Elektronen- stoß (EI = electron impact).

6.2 Synthesen

6.2.1 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-carbocyclohex-3-enylmethyl)-benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden in einem 100 ml Dreihalskolben 0,78 ml (7,5 mmol) Diisopropylamin in 25 ml abs. THF gelöst und auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur tropfte man 4 ml (7,5 mmol) Butyllithium-Lösung zu und rührte für 20 min bei -78°C . Nach Ablauf dieser Zeit wurden 0,9 ml (5 mmol) Isophoron zugefügt und weitere 15 min gerührt. Anschließend wurde das Kühlbad entfernt, erreichte die Reaktionslösung eine Temperatur von etwa -10°C wurden 3,0 g (10 mmol) 2-Nitro-5-Methoxy-benzylbromid in 5 ml abs. THF zugetropft. Man ließ das Reaktionsgemisch auf RT erwärmen und rührte weitere 4 h, hierbei kommt es zu einer intensiven dunkel Färbung der Lösung. Die Reaktion wurde in regelmäßigen Abstände durch DC kontrolliert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml verdünnter NH_4Cl Lösung abgebrochen. Die Phasen wurden in einen Schütteltrichter getrennt und die wässrige Phase mit 60 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten org. Phase wurde mit 30 ml Salzlösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Zur Aufreinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgel-Säule mit dem Laufmittel Cyclohexan : Ethylacetat (2 : 1) geführt. Es wurden 810 mg (27 %) eines blaß-gelben Feststoffes erhalten.

¹H-NMR

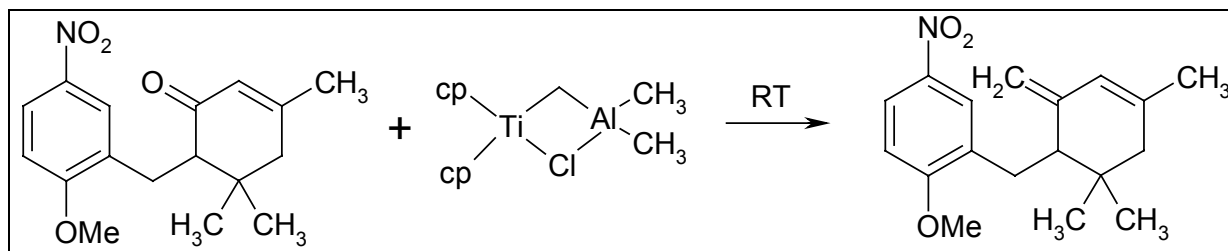
CDCl₃, 200 MHz: 1,02 (s, 3 H, C6-Isophoron), 1,07 (s, 3 H, C6-Isophoron), 1,93 (s, 3 H, C4-Isophoron), 2,21 (s, 2 H, Methylen), 2,35-2,42 (q, 1 H, C1-Isophoron, J=4,2 Hz), 2,78-2,87 (d, 2 H, Methylenbrücke, J=5,4 Hz), 3,88 (s, 3 H, Methoxy), 5,78 (s, 1 H, Vinyl), 6,79-6,84 (d, 1 H, C6-Aromat, J= 3,6 Hz), 8,03-8,09 (m, 2 H, C3 + C4-Aromaten).

¹³C-NMR

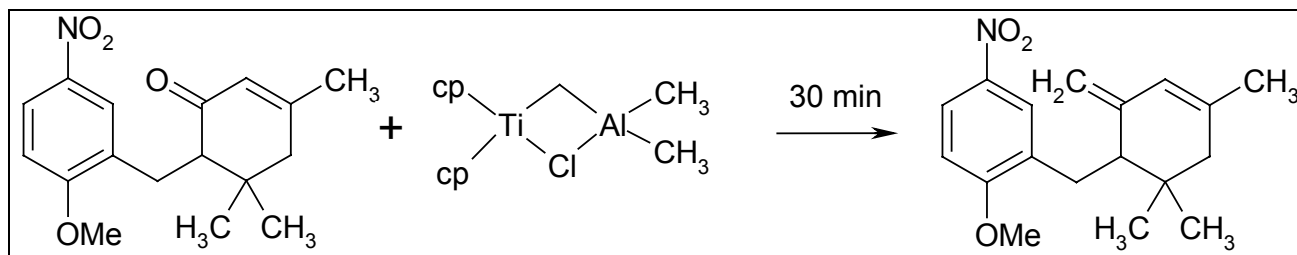
CDCl₃, 50 MHz: 23,7 (Methyl), 24,0 (Methyl), 26,3 (Methyl), 28,6 (Methylen), 32,8 (C6-Isophoron), 36,7 (Methylenbrücke), 55,8 (Methoxy), 56,6 (C1-Isophoron), 109,5 (C3-Atomat), 123,8 (C6-Aromat), 124,9 (C4-Aromat), 126,4 (C1-Aromat), 130,5 (CH-Vinyl) 141,5 (C5-Aromat), 157,7 (quart. Vinyl), 162,2 (C2-Aromat), 200,9 (Carbonyl)
Smp: 35-37°C

MS

303 (M⁺); 288 (M -CH₃); 260 (M - CH₃ -CO); 166 (M -Isophoron); 137 (Isophoron).

6.2.2.1 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylencyclo-hex-3-enylmethyl)benzen

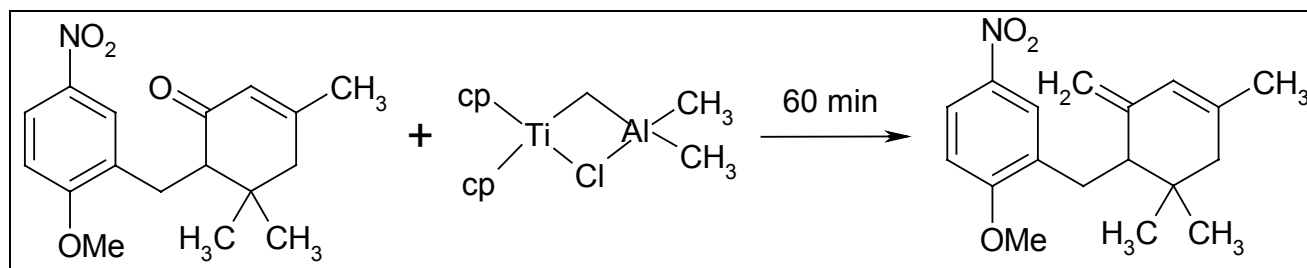
Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden in einem 50 ml Zweihals-Kolben 500 mg (2 mmol) des Ketons in 25 ml abs. THF vorgelegt und mit Eis auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur tropfte man langsam 2,5 ml einer 0,5 molaren Lösung von [(μ-chloro-μ-methylen)-[bis(cyclopentadienyl)titan]dimethyl-aluminium (Tebbe-Reagenz) zu. Die Reaktionslösung ließ man auf RT erwärmen und rührt weitere 4 h. Nach dieser Zeit wurde die Lösung wieder auf 0°C gekühlt und die Reaktion mit 5 ml verd. Natronlauge abgebrochen. Man überführte das Reaktionsgemisch in ein Scheidetrichter und extrahierte die wässrige Phase mit Ethylacetat. Die vereinigte organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Leider konnte kein Produkt isoliert werden.

6.2.2.2 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-cyclohex-3-enylmethyl)benzen

Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 1,0 ml (4 mmol) des Tebbe-Reagens in 5 ml abs. THF gelöst und auf -40°C gekühlt. Bei dieser Temperatur tropfte man 1,2 g (4 mmol) des Ketons in 5 ml abs. THF zu. Die Lösung wurde 30 min bei -40°C gerührt, anschließend ließ man die Reaktion langsam auf RT erwärmen.

Die Reaktion wurde auf -10°C gekühlt und durch Gabe von 0,3 ml 15% Natronlauge gestoppt. Nach dem Erwärmen auf RT wurde mit 50 ml Diethylether verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Es konnte kein Produkt isoliert werden.

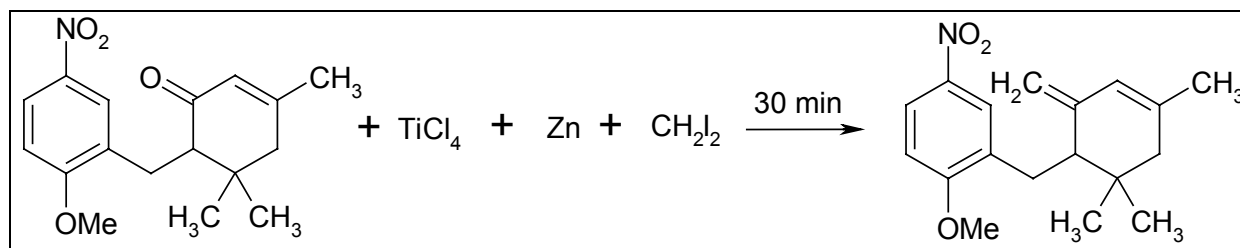
6.2.2.3 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-3-enylmethyl)benzen

Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 1,0 ml (4 mmol) des Tebbe-Reagens in 5 ml abs. THF gelöst und auf -40°C gekühlt. Bei dieser Temperatur tropfte man 1,2 g (4 mmol) des Ketons in 5 ml abs. THF zu. Die Lösung wurde 60 min bei -40°C gerührt, anschließend ließ man die Reaktion langsam auf RT erwärmen.

Die Reaktion wurde auf -10°C gekühlt und durch Gabe von 0,3 ml 15% Natronlauge gestoppt. Nach dem Erwärmen auf RT wurde mit 50 ml Diethylether verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt konnte nicht isoliert werden.

6.2.3 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-3-enylmethyl)benzen



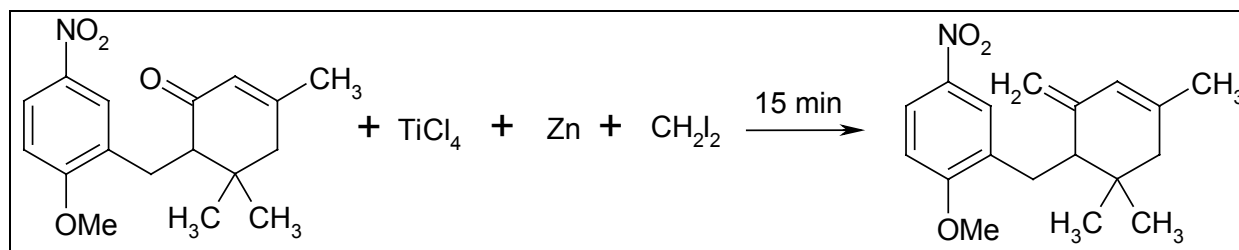
Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 1,0 g Zinkstaub in 20 ml abs. THF gelöst. Man gab 0,8 ml (2 mmol) Diiodmethan zu und ließ 30 min bei RT rühren. Nach dieser Zeit wurde die Lösung auf 0°C gekühlt. Vorsichtig tropfte man 0,12 ml (2 mmol) TiCl_4 , welches in 5 ml THF gelöst wurde, zu. Die Lösung wurde für weitere 30 min gerührt, anschließend fügte man 700 mg (2 mmol) des Ketons in 4 ml THF zu. Die Reaktion ließ man 30 min bei RT rühren.

Durch Zugabe von 5 ml Wasser wurde die Reaktion abgebrochen. Die beiden Phasen wurden in einem Scheidetrichter getrennt. Die wässrige Phase extrahierte man mit Ethylacetat. Die organische Phase wurde vereinigt und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule mit dem Laufmittelgemisch Hexan : Ethylacetat (3:1) geführt.

Das Produkt konnte nicht isoliert werden

6.2.3.2 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-cyclohex-3-enylmethyl)benzen



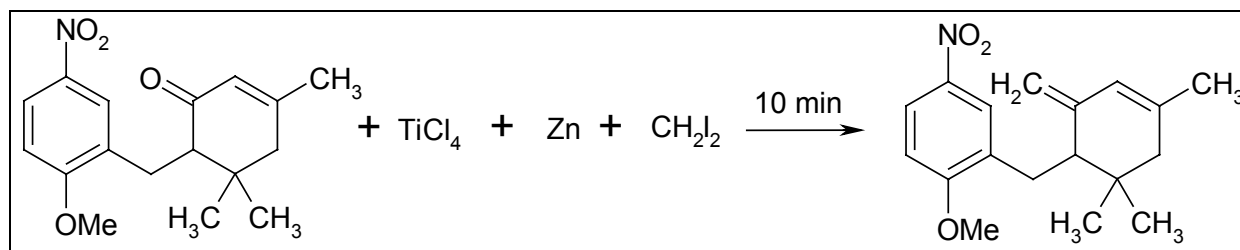
Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 1,0 g Zinkstaub in 20 ml abs. THF gelöst. Man gab 0,8 ml (2 mmol) Diiodmethan zu und ließ 30 min bei RT rühren. Nach dieser Zeit wurde die Lösung auf 0°C gekühlt. Vorsichtig tropfte man 0,12 ml (2 mmol) TiCl₄, welches in 5 ml THF gelöst wurde, zu. Die Lösung wurde für weitere 30 min gerührt, anschließend fügte man 700 mg (2 mmol) des Ketons in 4 ml THF zu. Die Reaktion ließ man 15 min bei RT rühren.

Durch Zugabe von 5 ml Wasser wurde die Reaktion abgebrochen. Die beiden Phasen wurden in einem Scheidetrichter getrennt. Die wässrige Phase extrahierte man mit Ethylacetat. Die organische Phase wurde vereinigt und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule mit dem Laufmittelgemisch Hexan : Ethylacetat (3:1) geführt.

Das Produkt konnte nicht gewonnen werden.

6.2.3.3 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-cyclohex-3-enylmethyl)benzen



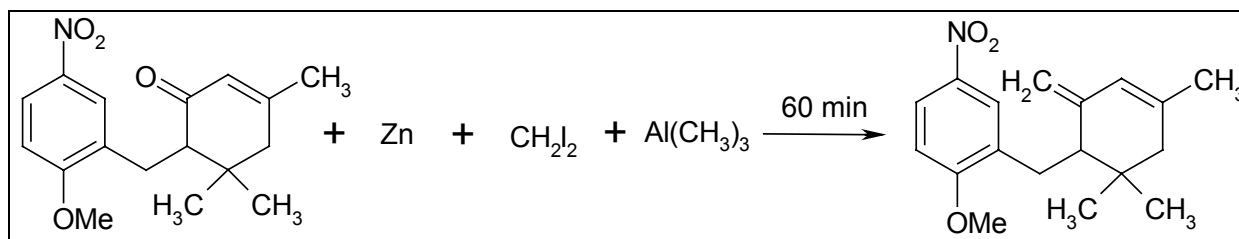
Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 1,0 g Zinkstaub in 20 ml abs. THF gelöst. Man gab 0,8 ml (2 mmol) Diiodmethan zu und ließ 30 min bei RT rühren. Nach dieser Zeit wurde die Lösung auf 0°C gekühlt. Vorsichtig tropfte man 0,12 ml (2 mmol) TiCl₄, welches in 5 ml THF gelöst wurde, zu. Die Lösung wurde für weitere 30 min gerührt, anschließend fügte man 700 mg (2 mmol) des Ketons in 4 ml THF zu. Die Reaktion ließ man 10 min bei RT rühren.

Durch Zugabe von 5 ml Wasser wurde die Reaktion abgebrochen. Die beiden Phasen wurden in einem Scheidetrichter getrennt. Die wässrige Phase extrahierte man mit Ethylacetat. Die organische Phase wurde vereinigt und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule mit dem Laufmittelgemisch Hexan : Ethylacetat (3:1) geführt.

Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

6.2.4 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylencyclo-hex-3-enylmethyl)benzen



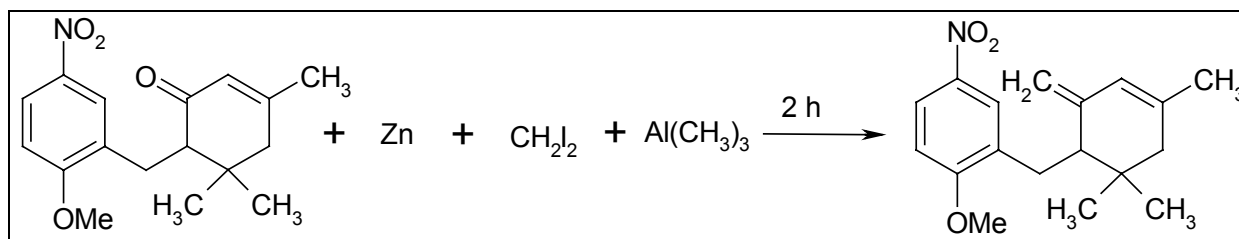
Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 1,18 g Zinkstaub und 0,8 ml (2 mmol) Diiodmethan in 10 ml abs. THF suspendiert. Bei RT wurden 0,9 ml einer 2 molaren Trimethylaluminum-Lösung zugetropft. Nach 10 min rühren wurde auf 0°C abgekühlt und 500 mg (1,7 mmol) des Ketons in 4 ml abs. THF zugegeben. Die Reaktion wurde 1 h bei RT gerührt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 ml einer 1 molarer Salzsäure abgebrochen und 2 mal mit 20 ml Salzlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch mit einem Laufmittelgemisch Hexan : Ethylacetat (3:1).

Es gelang nicht das Produkt zu isolieren.

6.2.4.2 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-cyclohex-3-enylmethyl)benzen



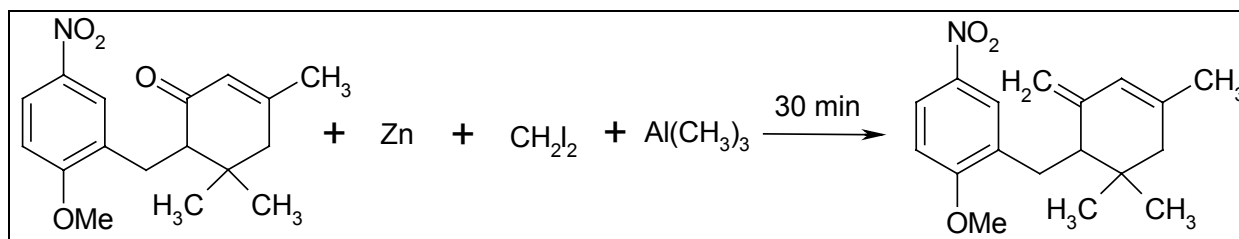
Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 1,18 g Zinkstaub und 0,8 ml (2 mmol) Diiodmethan in 10 ml abs. THF suspendiert. Bei RT wurden 0,9 ml einer 2 molaren Trimethylaluminum-Lösung zugetropft. Nach 15 min rühren wurde auf 0°C abgekühlt und 500 mg (1,7 mmol) des Ketons in 4 ml abs. THF zugegeben. Die Reaktion wurde 2 h bei RT gerührt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 ml einer 1 molarer Salzsäure abgebrochen und 2 mal mit 20 ml Salzlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch mit einem Laufmittelgemisch von Hexan : Ethylacetat (3:1).

Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

6.2.4.3 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-cyclohex-3-enylmethyl)benzen



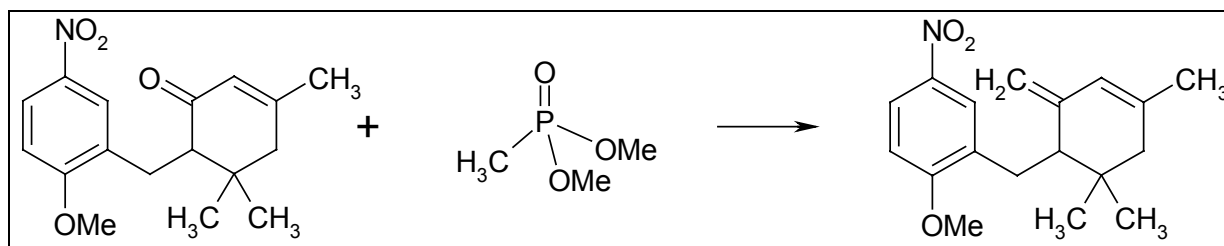
Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 1,18 g Zinkstaub und 0,8 ml (2 mmol) Diiodmethan in 10 ml abs. THF suspendiert. Bei RT wurden 0,9 ml einer 2 molaren Trimethylaluminum-Lösung zugetropft. Nach 30 min rühren wurde auf 0°C abgekühlt und 500 mg (1,7 mmol) des Ketons in 4 ml abs. THF zugegeben. Die Reaktion wurde 2 h bei RT gerührt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 ml einer 1 molarer Salzsäure abgebrochen und 2 mal mit 20 ml Salzlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch mit einem Laufmittelgemisch von Hexan : Ethylacetat (3:1).

Es gelang nicht das Produkt zu isolieren.

6.2.5 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylencyclo-hex-3-enylmethyl)benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 0,75 ml (3 mmol) Phosphonat in 50 ml abs. THF vorgelegt und auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 2,2 ml einer 1,6 molaren Butyllithium-Lösung hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach dieser Zeit wurden 1,1 g (3 mmol) des Eduktes in 10 ml abs. THF gelöst langsam zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und die Reaktion 16 h bei RT gerührt.

Um die Reaktion ab zu brechen, wurden 5 ml Wasser hinzugefügt. Die Reaktion wurde in ein Scheidetrichter überführt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde 2 mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule mit dem Laufmittel Hexan : Ethylacetat (3:1) geführt.

Man erhielt 450 mg (40%) eines schwach gelben Feststoffes.

¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 0,88 (s, 3 H, C6-Methyl), 1,14 (s, 3 H, C6-Methyl), 1,80 (s, 3 H, C4-Methyl), 2,13-2,17 (d, 2 H, Brückenmethylen, J=12 Hz), 3,02-3,06 (d, 1 H, C1-Isophoron, J=12 Hz), 3,87 (s, 1 H, exocyclische Methylengruppe), 3,92 (s, 3 H, Methoxy), 4,51 (s, 1 H, exocyclische Methylengruppe), 5,82 (s, 1 H, Vinyl), 6,86-6,91 (d, 1 H, C3-Aromat, J=15 Hz), 7,80 (s, 1 H, C6-Aromat), 8,07-8,10 (d, 1 H, C4-Aromat J=9 Hz).

¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 23,2 (Methyl), 25,4 (Methyl), 26,1 (Methyl), 35,2 (Methylenbrücke), 45,5 (Methylen), 51,1 (C1-Isophoron), 56,0 (Methoxy), 109,1 (exocyclische Methylengruppe), 111,0 (C3-Aromat), 123,5 (C6-Aromat), 127,0 (C4-Aromat), 130,9 (C1-Aromat), 133,8 (CH-Vinyl), 140,7 (C2-Isophoron), 141,5 (C5-Aromat), 144,6 (quart. Vinyl), 162,2 (C2-Aromat).

MS

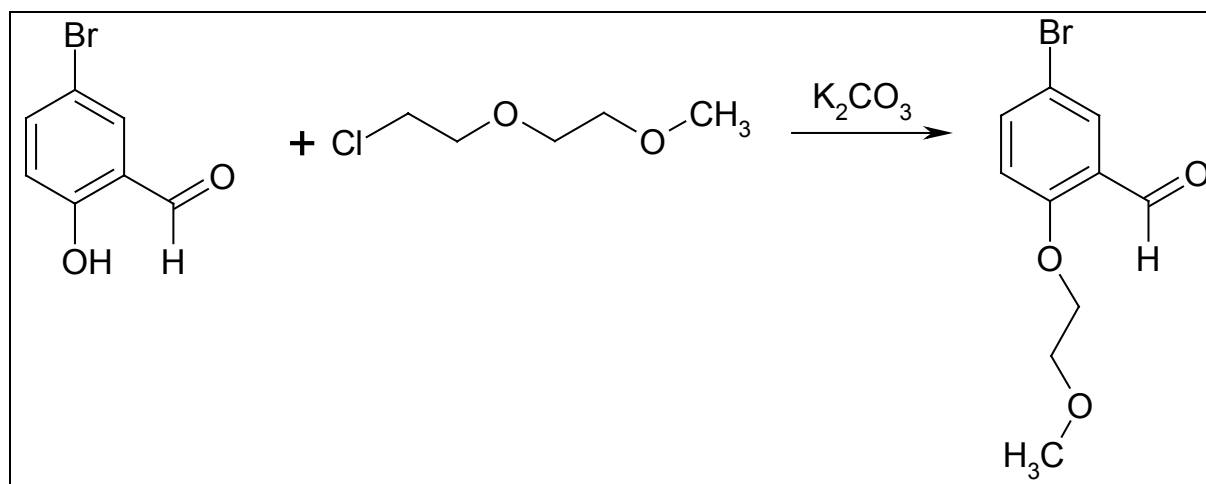
301 (M⁺), 286 (M -CH₃), 271 (M -OCH₃, +H), 166 (M -Isophoron), 135 (Isophoron+)

Smp: 36-37°C

Elementaranalyse

	ber.	gef.
C	71,73	71,90
H	7,69	7,75
N	4,65	4,75

6.2.6 Synthese von 2-(2'-Methoxy-ethylether)-5-Brom-benzaldehyd



In 100 ml getrocknetem Dimethylformamid (DMF) wurden 7,0 g (35 mmol) des Aldehyds und 5,81 g (35 mmol) KI und 4,8 g (35 mmol) K₂CO₃ gelöst. Anschließend wurden langsam 3,3 ml (35 mmol) 2-Chloro-2'-methoxy-ethylether zugetropft. Die Reaktion wurde für 6 h bei 150°C gerührt. Das Ölbad wurde entfernt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Die Reaktion wurde in ein Scheidetrichter überführt und dort mehrfach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit einem Laufmittelgemisch von Hexan : Ethylacetat (2:1).

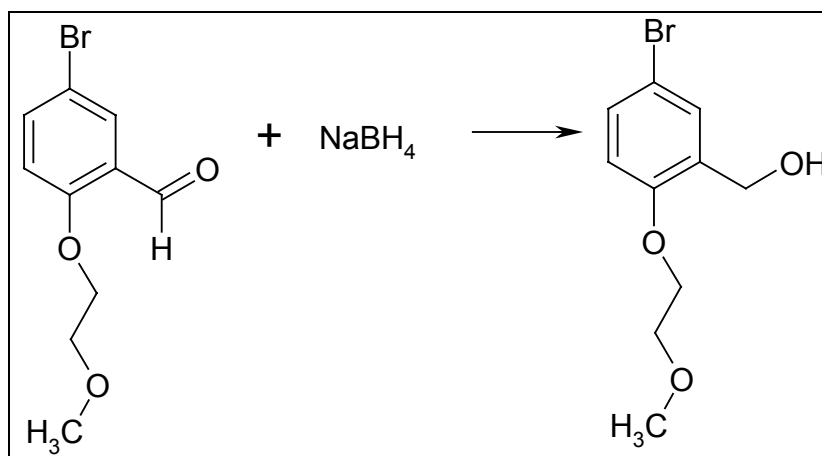
Man erhielt 7,4 g (82%) eines weißen Feststoffes.

¹H-NMR

CDCl₃, 300 Mhz: 3,43 (s, 3 H, Methoxy), 3,79 (s, 2 H, C2'-Methylen), 4,21 (s, 2 H, C1'-Methylen), 6,87-6,90 (d, 1 H, C3-Aromat), 7,57-7,60 (d, 1 H, C4-Aromat), 7,90 (s, 1 H, C6-Aromat), 10,41 (s, 1 H, Aldehyd).

¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 59,3 (Methoxy), 68,5 (Methylen-C1'), 70,6 (Methylen-C2'), 113,8 (C5-Aromat), 114,9 (C3-Aromat), 126,3 (C1-Aromat), 130,9 (C6-Aromat), 138,2 (C4-Aromat), 160,1 (C2-Aromat), 188,1 (Aldehyd).

6.2.7 Synthese von 2-(2'-Methoxy-ethylether)-5-Brom-benzylalkohol

Es wurden 7,4 g (28 mmol) des Aldehyds in 50 ml abs. Methanol und 50 ml abs. THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden vorsichtig 5 g (0,13 mol) NaBH_4 zugegeben. Man ließ die Reaktion auf RT erwärmen und rührte 1,5 h bei RT.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 molarer Salzsäure auf ein pH-Wert von etwa 5 eingestellt. Die Lösung wurde in ein Scheidetrichter überführt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt.

Man erhielt 7,25 g (97%) eines weiß-braunen Feststoffes.

 $^1\text{H-NMR}$

CDCl_3 , 300 MHz: 3,11 (s, 1 H, Alkohol), 3,14 (s, 3 H, Methoxy), 3,70-3,73 (t, 2 H, C2'-Methylen), 4,12-4,15 (t, 2 H, C1'-Methylen), 4,60 (s, 2 H, Benzyl-Methylen), 6,73-6,75 (d, 1 H, C3-Aromat), 7,32-7,36 (d, 1 H, C4-Aromat), 7,38 (s, 1 H, C6-Aromat).

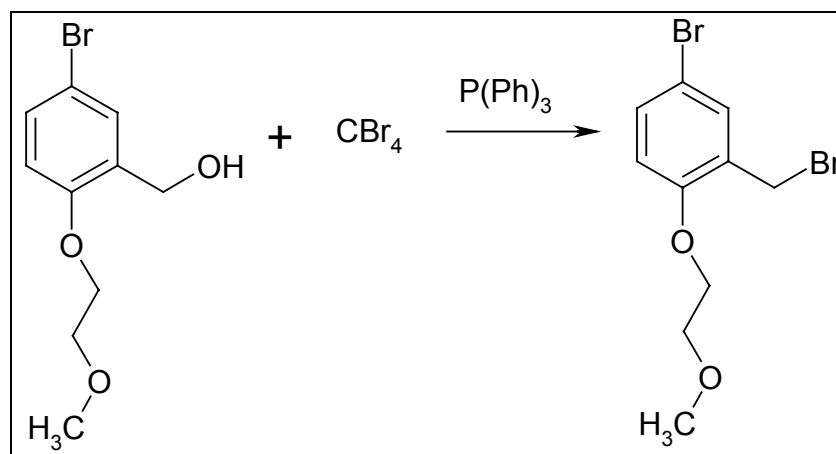
 $^{13}\text{C-NMR}$

CDCl_3 , 50 MHz: 59,0 (Methoxy), 61,4 (Alkohol), 68,2 (C2'-Methylen), 70,7 (C1'-Methylen), 113,5 (C5-Aromat), 114,9 (C3-Aromat), 131,3 (C6-Aromat), 131,6 (C1-Aromat), 132,5 (C4-Aromat), 155,9 (C2-Aromat).

Smp: 77-80°C

MS: 332, 334 $[\text{M}^+]$, 254 $[\text{M} - \text{Br}]$,

6.2.8 Synthese von 2-(2'-Methoxy-ethyl ether)-5-Brom-benzylbromid



In 75 ml abs. DCM wurden 7,2 g (27 mmol) des Benzylalkohols und 7,4 g (27 mmol) Triphenylphosphin gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur fügte man langsam 9,3 g (27 mmol) Tetrabromkohlenstoff zu und rührte 1 h. Anschließend wurde das Kühlbad entfernt und weitere 2 h bei RT gerührt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Wasser beendet und in einen Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wurde 3 mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch mit einem Eluentengemisch aus Hexan : Ethylacetat (2:1).

Man erhielt 3,3 g (37%) eines schwach braunen Feststoffes.

¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 3,46 (s, 3 H, Methoxy), 3,77-3,80 (t, 2 H, Methylen-C2', J=9 Hz), 4,14-4,17 (t, 2 H, Methylen-C1', J=9 Hz), 4,49 (s, 2 H, Benzyl-Methylen), 6,75-6,77 (d, 1 H, C3-Aromat, J=6 Hz), 7,31-7,33 (d, 1 H, C4-Aromat, J=6 Hz), 7,44 (s, 1 H, C6-Aromat).

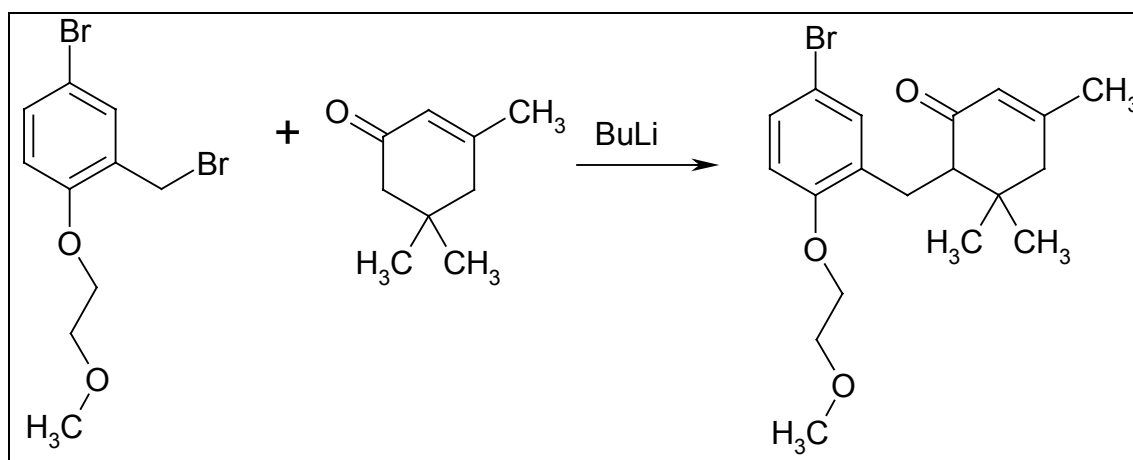
¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 27,6 (Benzyl-C), 59,4 (Methoxy), 68,4 (Methylen-C1'), 70,9 (Methylen-C2'), 112,9 (C5-Aromat), 114,0 (C3-Aromat), 128,7 (C6-Aromat), 132,7 (C1-Aromat), 133,5 (C4-Aromat), 155,8 (C2-Aromat).

MS

322, 324 (M⁺); 243, 245 (M -Br); 213, 215 (M -Br -OCH₃); 133 (M -2 Br -OCH₃)

6.2.9 Synthese von 2-(2'-Methoxy-ethylether)-5-brom-1-(4,6,6-trimethyl-2-carbocyclohex-3-enylmethyl)benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 0,5 ml (5 mmol) Diisopropylamin in 25 ml abs. THF vorgelegt. Die Lösung wurde auf -78°C gekühlt, bei dieser Temperatur wurden 3,1 ml einer 1,6 molaren Butyllithium-Lösung zugegeben und 20 min bei -78°C gerührt. Nach dieser Zeit wurden 0,56 ml (4 mmol) Isophoron zur Lösung getropft und weitere 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde das Kältebad entfernt, sobald die Reaktionslösung eine Temperatur von -10°C erreichte, tropfte man 1,5 g (5 mmol) Benzylbromid in 10 ml abs. THF gelöst zu. Die Reaktion rührte 4 h bei RT.

Um die Reaktion zu beenden, wurden 10 ml verd. NH_4Cl -Lösung beigemischt. Die wässrige Phase wurde 2 mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit dem Eluentengemisch Hexan: Ethylacetat (2:1) gereinigt.

Man erhielt 0,5 g (28%) eines intensiv gelb-orange gefärbten Feststoffes.

¹H-NMR

CDCl₃, 300 Mhz: 1,09 (s, 3 H, C6-Isophoron), 1,24 (s, 3 H, C6-Isophoron), 1,90 (s, 3 H, C4-Isophoron), 2,19 (s, 2 H, Methylen), 2,46-2,47 (d, 1 H, C1-Isophoron, J=9 Hz), 2,66-2,73 (t, 1 H, Methylenbrücke, J=18 Hz), 2,86-2,92 (d, 1 H, Methylenbrücke, J=18 Hz), 3,39 (s, 3 H, Methoxy), 3,71-3,72 (t, 2 H, Methylen-C2', J=9 Hz), 4,00-4,10 (m, 2 H, Methylen-C1'), 5,78 (s, 1 H, Vinyl-H), 6,62-6,65 (d, 1 H, C3-Aromat J=9 Hz), 7,18-7,21 (d, 1 H, C4-Aromat, J=9 Hz), 7,42 (s, 1 H, C6-Aromat)

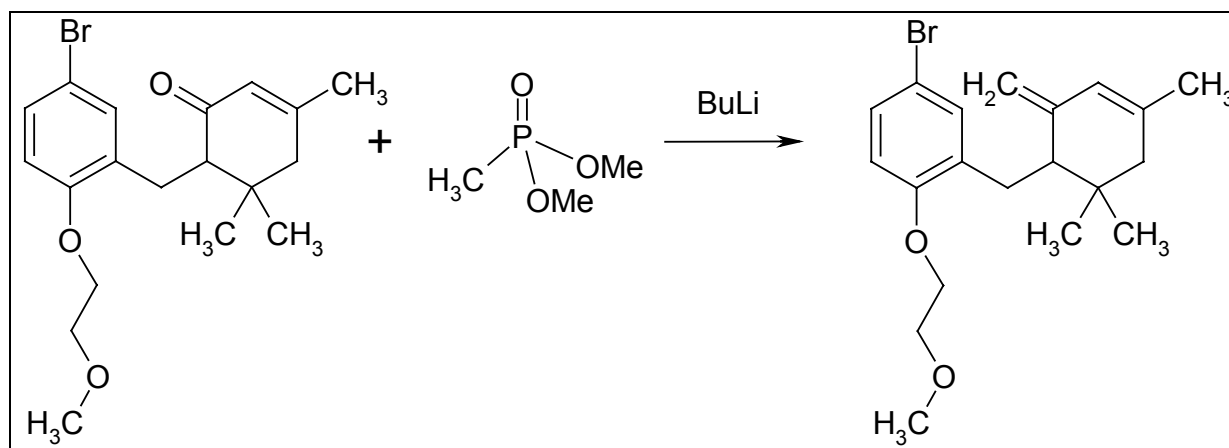
¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 23,5 (Methyl), 24,0 (Methyl), 26,2 (Methyl), 28,5 (Methylengruppe), 30,9 (C6-Isophoron), 36,9 (Benzyl-C), 45,1 (C-Vinyl), 56,9 (C1-Isophoron), 58,9 (Methoxy), 67,4 (Spacer-C1'), 70,9 (Spacer-C2'), 112,7 (C5-Aromat), 125,0 (C3-Aromat), 129,7 (C6-Aromat), 132,0 (C1-Aromat), 134,0 (C4-Aromat), 155,2 (C2-Aromat) 157,3 (quart. Vinyl C), 201,4 (Keton).

MS

380, 382 (M⁺), 365, 367 (M -CH₃), 333,335 (M -OCH₃, -O), 243, 245 (M - Isophoron).

6.2.10 Synthese von 2-(2'-Methoxy-ethylether)-5-brom-1-(4,6,6-trimethyl-2-methylencyclohex-3-enylmethyl)benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 0,145 ml (1,5 mmol) Phosphonat in 25 ml abs. THF gelöst und auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur tropfte man 1,2 ml einer 1,6 molaren Butyllithium-Lösung zur Reaktion und rührte 20 min bei dieser Temperatur. Nach dieser Zeit wurden 0,5 g (1,5 mmol) des Eduktes in 10 ml abs. THF gelöst und zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde die Reaktion langsam auf RT erwärmt und für weitere 16 h bei RT gerührt.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml Wasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde im Scheidetrichter 3 mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule geführt und mit Hexan : Ethylacetat (4:1) eluiert.

Man erhielt 120 mg (24%) eines orangen Feststoffes.

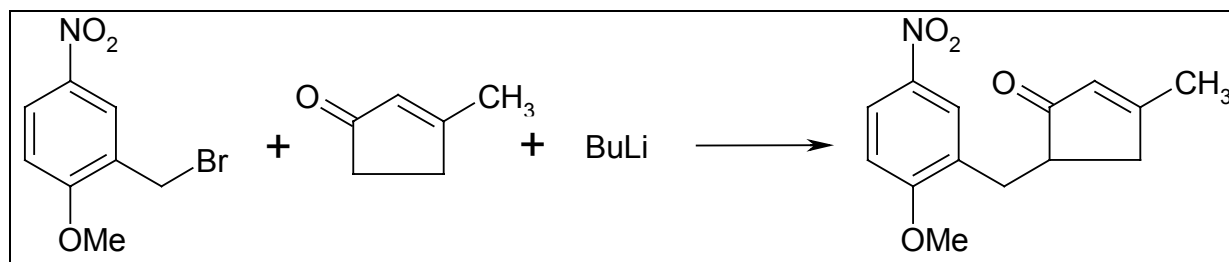
¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 0,94 (s, 3 H, C6-Isophoron), 1,14 (s, 3 H, C6-Isophoron), 2,03 (s, 3 H, C4-Isophoron), 3,02-3,06 (t, 1 H, C1-Isophoron, J=10 Hz), 3,48 (s, 3 H, Methoxy), 3,73-3,76 (t, 2 H, Methylengruppe, J=9 Hz), 3,92-3,94 (d, 1 H, exocyclische Methylen, J=5,2 Hz), 3,98-4,10 (m, 2 H, Brückenmethylen), 4,55 (s, 1 H, exocyclische Methylen), 5,82 (s, 1 H, Vinyl), 6,65-6,68 (d, 1 H, C3-Aromat, J=9 Hz), 7,01 (s, 1 H, C4-Aromat), 7,23-7,27 (d, 1 H, C6-Aromat, J=10 Hz).

¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 23,2 (Methyl), 23,8 (Methyl), 26,7 (Methyl), 28,4 (Methylen), 30,9 (C6-Isophoron), 36,6 (Methylenbrücke), 57,0 (C1-Isophoron), 58,8 (Methoxy), 67,4 (Spacer C1), 70,9 (Spacer C2), 104,3 (exocyclische Methylen), 112,5 (C5-Aromat), 125,1 (C3-Aromat), 129,8 (C6-Aromat), 131,4 (CH-Vinyl), 131,8 (C1-Aromat), 134,2 (C4-Aromat), 137,6 (C2-Isophoron), 155,5 (C2-Aromat), 157,0 (quart. Vinyl)

6.2.11 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4-methyl-2-carboxy-cyclopent-3-enylmethyl)-benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 0,25 ml (0,25 mmol) Diisopropylamin in 10 ml abs. THF gelöst und auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 1,5 ml einer 1,6 molaren Butyllithium-Lösung zur Reaktion zugetropft. Das Gemisch wurde für 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach dieser Zeit fügte man 0,24 ml (0,25 mmol) Cyclopentenon zur Lösung hinzu und ließ weitere 20 min bei dieser Temperatur rühren. Anschließend wurde das Kühlbad entfernt und bei einer Temperatur von -10°C tropfte man 0,6 g (2,5 mmol) des Benzylbromids in 5 ml abs. THF gelöst zu. Man ließ die Reaktion auf RT erwärmen und rührte 16 h bei RT.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Wasser abgebrochen. Die Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase 2 mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt, wobei ein Eluentengemisch von Hexan : Ethylacetat (2:1) verwendet wurde.

Man erhielt 190 mg (30%) eines gelben Feststoffes.

¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 2,05 (s, 2 H, Methylen), 2,12 (s, 3 H, Methyl), 2,55-2,60 (m, 2 H, Methylenbrücke), 3,30-3,36 (m, 1 H, C1-Cyclopentenon), 3,95 (s, 3 H, Methoxy), 5,97 (s, 1 H, Vinyl), 6,90-6,93 (d, 1 H, C3-Aromat, J=2,6 Hz), 8,06 (s, 1 H, C6-Aromat), 8,14-8,18 (d, 1 H, C4-Aromat, J=3,4 Hz)

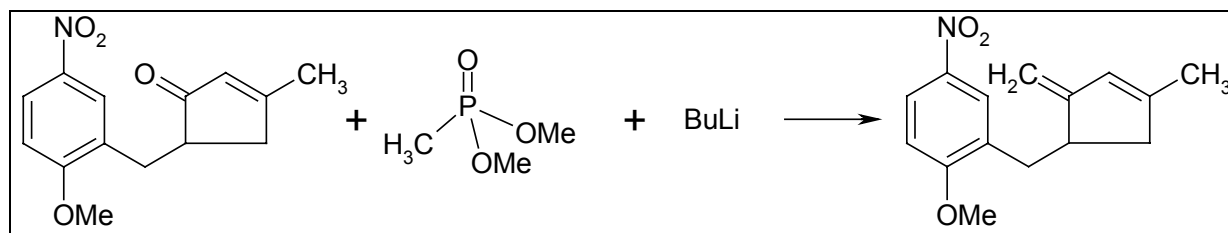
¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 19,4 (Methyl), 31,8 (Methylen) 39,3 (Brückenmethylen), 45,7 (C1-Isophoron), 109,8 (C3-Aromat), 124,2 (C6-Aromat), 125,5 (C4-Aromat), 129,5 (C1-Aromat), 129,6 (CH-Vinyl), 141,1 (C5-Aromat), 177,1 (quart. Vinyl), 162,6 (C2-Aromat), 210,2 (Carbonyl).

MS:

261 (M +), 245 (M -CH₃, -H), 214 (M -OCH₃, -O), 186 (M -NO₂ - OCH₃, + 2 H), 166 (M - Isophoron),

6.2.12 Synthese von 2-Methoxy-5-nitro-1-(4-methyl-2-methylen-cyclopent-3-enylmethyl)-benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 95 μl (0,7 mmol) des Phosphonats in 5 ml abs. THF vorgelegt und auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 450 μl einer 1,6 molaren Butyllithium-Lösung zugefügt und für 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach dieser Zeit wurden 190 mg (0,7 mmol) des Ketons in 3 ml abs. THF zugetropft. Man ließ die Reaktion langsam auf RT erwärmen und 16 h bei dieser Temperatur rühren.

Durch Zugabe von 10 ml Wasser wurde die Reaktion abgebrochen. Im Scheidetrichter wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt.

Die Reinigung erfolgte durch eine Kieselsäule und dem Laufmittelgemisch Hexan : Ethylacetat (4:1).

Man erhielt 20 mg (12%) eines orange-roten Feststoffes

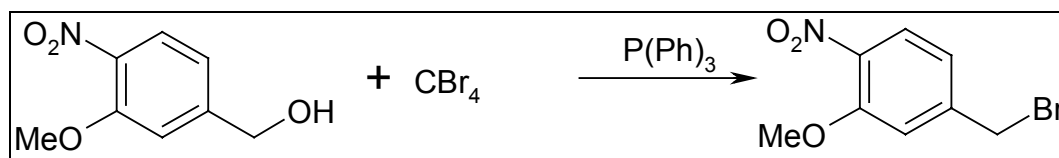
$^1\text{H-NMR}$

CDCl_3 , 300 MHz: 1,91 (s, 2 H, Methylen), 1,98 (s, 3 H, Methyl), 2,74 (s, 2 H, Methylenbrücke), 3,63 (s, 1 H, C1-Cyclopentenon), 3,96 (s, 1 H, exocyclische Methylengruppe), 4,03 (s, 3 H, Methoxy), 4,55 (s, 1 H, exocyclische Methylengruppe), 5,94 (s, 1 H, Vinyl), 6,96-6,99 (d, 1 H, C3-Aromat), 7,94 (s, 1 H, C6-Aromat), 8,22-8,25 (d, 1 H, C4-Aromat)

$^{13}\text{C-NMR}$

CDCl_3 , 50 MHz: 15,9 (Methyl), 31,9 (Methylen), 38,7 (Brückenmethylen), 43,4 (C1-Isophoron), 109,6 (C3-Aromat), 110,6 (exocyclische Methylengruppe), 124,6 (C6-Aromat), 125,1 (C4-Aromat), 128,7 (C1-Aromat), 130,8 (CH-Vinyl), 132,4 (C2-Cyclopenten), 141,1 (C5-Aromat), 162,1 (C2-Aromat), 167,7 (quart. Vinyl).

6.2.13 Synthese von 3-Methoxy-4-nitro-benzylbromid



Es wurden 3 g (16 mmol) des Benzylalkohols in 50 ml getrocknetem DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 4,3 g (16 mmol) Triphenylphosphin zugefügt. Anschließend gab man vorsichtig in 3 Portionen insgesamt 4,7 g (16 mmol) Tetrabromkohlenstoff hinzu und ließ die Reaktion langsam auf RT erwärmen. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt.

Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 15 ml Wasser. Die Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase 3 mal mit DCM gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert.

Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit dem Eluentengemisch Hexan : Ethylacetat (2:1).

Man erhielt 1,1 g (28%) eines gelben Feststoffes.

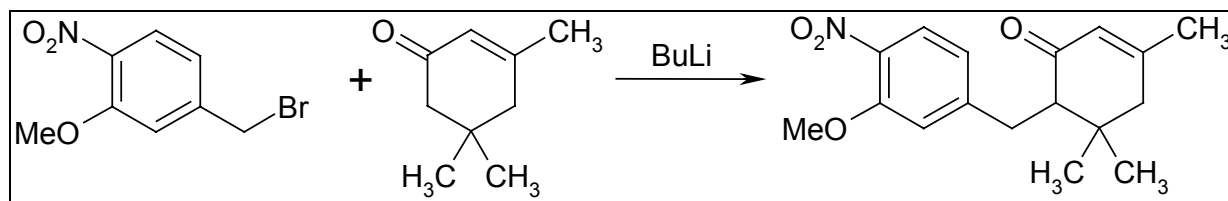
¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 3,99 (s, 3 H, Methoxy), 4,47 (s, 2 H, Methylen), 7,04-7,07 (d, 1 H, C2-Aromat, J=7,8 Hz), 7,12 (s, 1 H, C6-Aromat), 7,82-7,85 (d, 1 H, C5-Aromat, J=7,8 Hz)

¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 31,4 (Benzylmethylen), 56,6 (Methoxy), 114,0 (C2-Aromat), 120,7 (C6-Aromat), 126,2 (C5-Aromat), 139,2 (C4-Aromat), 144,3 (C1-Aromat), 153,1 (C3-Aromat).

6.2.14 Synthese von 2-Methoxy-1-nitro-4-(4,6,6-trimethyl-2-carboxy-cyclohex-3-enylmethyl)-benzen



Unter ein Stickstoff-Atmosphäre wurden 0,25 ml (2,5 mmol) Diisopropylamin in 10 ml abs. THF gelöst und auf -78°C gekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurden 1,5 ml einer 1,6 molaren Butyllithium-Lösung zugetropft und die Reaktion für weitere 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend fügte man 0,3 ml (2,5 mmol) Isophoron zu und rührte wieder 20 min bei -78°C . Nach dieser Zeit wurde das Kühlbad entfernt, erreichte die Reaktion eine Temperatur von -10°C wurden 0,6 g (2,5 mmol) des Benzylbromides in 5 ml abs. THF zugetropft und 6 h bei RT gerührt.

Durch Zugabe von 10 ml Wasser wurde die Reaktion beendet. Die Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel entfernt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule mit den Lösungsmittelgemisch Hexan : Ethylacetat (2:1) geführt.

Man erhielt 80 mg (11%) eines gelben Feststoffes.

¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 0,98 (s, 3 H, C6-Isophoron), 1,17 (s, 3 H, C6-Isophoron), 1,95 (s, 3 H, C4-Isophoron), 2,18-2,21 (d, 2 H, Methylen, J=9,2 Hz), 2,39-2,42 (d, 1 H, C1-Isophoron, J=9,2 Hz), 2,70-2,75 (d, 1 H, Brückenmethylen, J=15 Hz), 3,07-3,14 (q, 1 H, Brückenmethylen, J=21 Hz), 3,97 (s, 3 H, Methoxy), 5,87 (s, 1 H, Vinyl), 6,83-6,86 (d, 1 H, C6-Aromat, J=9,2 Hz), 7,04 (s, 1 H, C2-Aromat), 7,78-7,81 (d, 1 H, C5-Aromat, J=9,2 Hz).

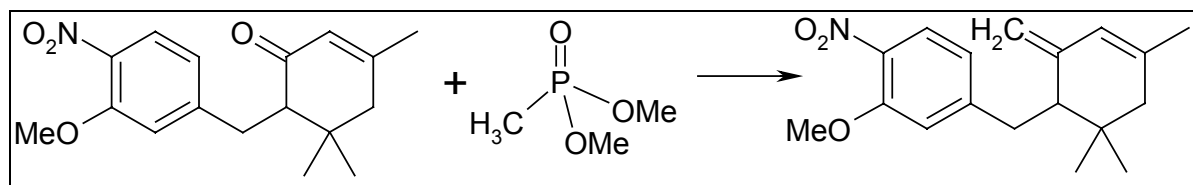
¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 22,3 (Methyl), 24,1 (Methyl), 29,1 (Methyl), 31,0 (C6-Isophoron), 37,2 (Methylenbrücke), 56,4 (Methoxy), 58,9 (C1-Isophoron), 114,4 (C2-Aromat), 120,6 (C6-Aromat), 125,1 (C5-Aromat), 125,8 (C4-Aromat), 130,1 (CH-Vinyl), 150,1 (C1-Aromat), 153,2 (C5-Aromat), 158,3 (quart. Vinyl), 200,1 (Carbonyl).

MS

303 (M⁺), 288 (M - CH₃), 257 (M - CH₃ - OCH₃), 226 (M - OCH₃ - NO₂), 168 (M - Isophoron).

6.2.15 Synthese von 2-Methoxy-1-nitro-4-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-cyclohex-3-enylmethyl)-benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 40 μ l (0,4 mmol) des Dimethoxy-methylphosphonats in 5 ml abs. THF vorgelegt. Die Lösung wurde auf -78°C gekühlt und bei dieser Temperatur wurden 200 μ l (0,3 mmol) Butyllithium-Lösung zugetropft. Die Reaktion wurde für 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach dieser Zeit tropfte man 80 mg (0,3 mmol) des Ketons in 2 ml abs. THF zu und ließ die Reaktion auf RT erwärmen. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Wasser gequencht. Die Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase mit DCM ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch mit den Eluenten Hexan : Ethylacetat (4:1).

Man erhielt 14 mg (17%) eines orangen Feststoffes.

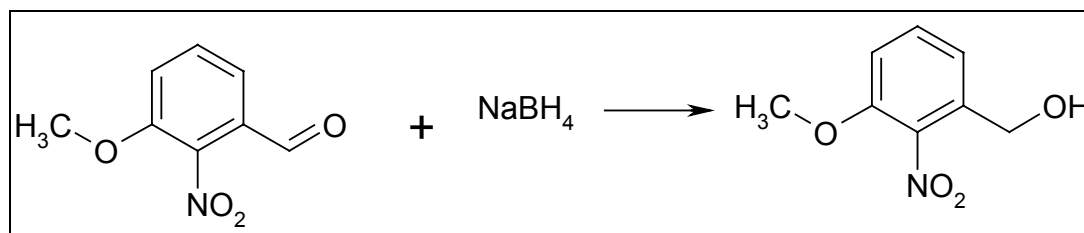
$^1\text{H-NMR}$

CDCl_3 , 300 MHz: 1,01 (s, 3 H, C6-Isophoron-Methyl), 1,15 (s, 3 H, C6-Isophoron-Methyl), 1,98 (s, 3 H, C4-Isophoron-Methyl), 2,15-2,19 (d, 2 H, Methylen, $J=12$ Hz), 3,03-3,06 (d, 1 H, C1-Isophoron, $J=9$ Hz), 3,92 (s, 1 H, exocyclische Methylengruppe), 4,01 (s, 3 H, Methoxy), 4,41 (s, 1 H, exocyclische Methylengruppe), 5,81 (s, 1 H, Vinyl), 6,81-6,85 (d, 1 H, C6-Aromat, $J=12$ Hz), 7,06 (s, 1 H, C2-Aromat), 7,75-7,78 (d, 1 H, C5-Aromat, $J=9$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$

CDCl_3 , 50 MHz: 22,4 (Methyl), 24,1 (Methyl), 29,3 (Methyl), 31,4 (C6-Isophoron), 38,1 (Methylenbrücke), 56,4 (Methoxy), 110,9 (exocyclische Methylengruppe), 114,4 (C2-Aromat), 120,6 (C6-Aromat), 125,4 (C5-Aromat), 126,1 (C4-Aromat), 131,3 (C2-Isophoron), 141,2 (C1-Aromat), 150,8 (CH-Vinyl), 152,7 (C5-Aromat), 159,1 (quart. Vinyl).

6.2.16 Synthese von 3-Methoxy-2-Nitro-benzylalkohol



In 20 ml wasserfreiem Methanol und 20 ml getrocknetem THF wurden 1,0 g (5,5 mmol) des 3-Methoxy-2-Nitro-benzaldehyds gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden vorsichtig 840 mg (22 mmol) Natriumborhydrid zugefügt. Man ließ die Reaktion langsam auf RT erwärmen und rührte weitere 3 h bei dieser Temperatur.

Durch Zugabe von 1 n Salzsäure wurde die Reaktion abgebrochen und die Lösung auf einen pH-Wert von etwa 5 eingestellt. Die Phasen wurden im Scheidtrichter getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat mehrfach extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt aus Hexan umkristallisiert.

Man erhielt 850 mg (85%) eines leicht gelben Feststoffes.

¹H-NMR:

CDCl₃, 300 MHz: 2,12 (s, 1 H, Alkohol), 3,92 (s, 3 H, Methoxy), 4,66 (s, 2 H, Methylen-Gruppe), 7,00-7,04 (d, 1 H, C4-Aromat), 7,12-7,15 (d, 1 H, Aromat C6), 7,43-7,48 (t, 1 H, C5-Aromat)

¹³C-NMR:

CDCl₃, 50 MHz: 56,5 (Alkohol), 61,0 (Methoxy), 112,2 (C4-Aromat), 120,5 (C6-Aromat), 131,6 (C2-Aromat), 134,3 (C5-Aromat), 140,1 (C1-Aromat), 151,1 (C3-Aromat).

MS:

183: (M⁺), 166 (M -OH), 150 (M -OH, -O), 135 (M -OCH₃, -OH), 120 (M -NO₂, -OH), 106 (M -NO₂, -CH₂OH)

Elementaranalyse

	ber.	gef.
C	49,71	49,27
H	4,17	4,22
N	8,28	8,01

6.2.17 Synthese von 3-Methoxy-2-Nitro-benzylbromid

Es wurden 850 mg (4,6 mmol) des Benzylalkohols in 25 ml DCM gelöst. Man gab 1,2 g (4,6 mmol) Triphenylphosphin hinzu und kühlte auf 0°C. Bei dieser Temperatur wurden langsam 1,5 g (4,6 mmol) Tetrabromkohlenstoff zur Lösung gegeben. Die Reaktion wurde langsam auf RT erwärmt und rührte bei dieser Temperatur weitere 4 h.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Wasser beendet. Im Scheidetrichter wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase 3 mal mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedunstet.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit den Laufmitteln Hexan : Ethylacetat (2:1) gereinigt.

Man erhielt 300 mg (27%) eines weiß-bräunlichen Feststoffes.

¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 3,92 (s, 3 H, Methoxy), 4,44 (s, 2 H, Methylen), 7,01-7,04 (d, 1 H, C4-Aromat, J=2,5 Hz), 7,08-7,11 (d, 1 H, C6-Aromat, J=2,3 Hz), 7,40-7,46 (t, 1 H, C5-Aromat, J=4,9)

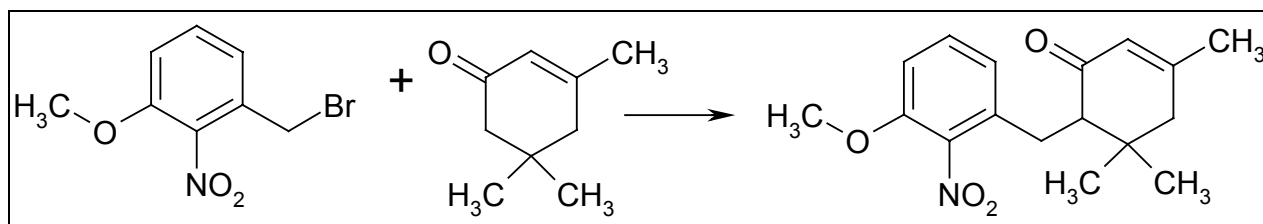
¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 26,0 (Methylen), 56,6 (Methoxy), 112,9 (C4-Aromat), 122,4 (C6-Aromat), 130,8 (C5-Aromat), 131,4 (C1-Aromat), 140,8 (C2-Aromat), 151,2 (C3-Aromat).

MS

245/247 (M⁺), 166 (M -Br), 135 (M -OCH₃, -CH₂Br), 120 (M -Br, -NO₂),

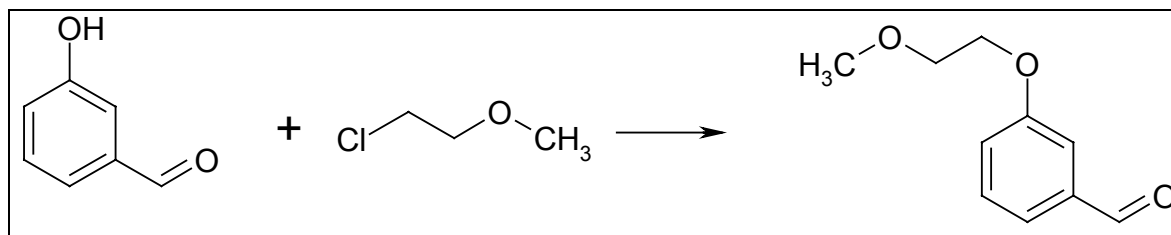
6.2.18 Synthese von 3-Methoxy-2-nitro-1-(4,6,6-trimethyl-2-carboxy-cyclohex-3-enylmethyl)-benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 0,17 ml (1,7 mmol) Diisopropylamin in 10 ml abs. THF vorgelegt und wurden auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur gab man 1,5 ml (2,25 mmol) einer Butyllithium-Lösung hinzu und ließ 20 min bei dieser Temperatur rühren. Nach dieser Zeit gab man 0,23 ml (1,7 mmol) Isophoron zu und rührte weitere 20 min bei -78°C . Anschließend wurde das Kühlbad entfernt, erreichte die Lösung eine Temperatur von etwa -10°C wurden 410 mg (1,6 mmol) des Benzylbromides in 10 ml abs. THF zugetropft. Die Reaktion wurde 4 h bei RT gerührt. Durch Zugabe von 10 ml Wasser wurde die Reaktion beendet. Im Scheidetrichter wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase 3 mal mit DCM gewaschen. Die organische Lösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel entfernt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule mit den Eluenten Hexan : Ethylacetat (2:1) geführt.

Es konnte kein Produkt isoliert werden.

6.2.19 Synthese von 3-(2-Methoxy-ethylether)-benzaldehyd

Es wurden 5,0 g (40 mmol) des Benzylaldehydes werden in 30 ml abs. DMF gelöst. Man gab weiterhin 5,52 g (40 mmol) Kaliumcarbonat sowie 6,64 g (40 mmol) Kaliumiodid und 3,7 ml (45 mmol) 1-Chloro-2-Methoxy-ethan zur Lösung. Die Suspension wurde für 5 h bei 150 °C gerührt. Die Reaktion wurde nach dem Abkühlen durch Zugabe von Wasser beendet. Im Scheidetrichter wurden die Phasen durch Zugabe von DCM getrennt. Die wässrige Phase extrahierte man mehrfach mit DCM. Das überschüssige DMF wurde mit Wasser ausgewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert.

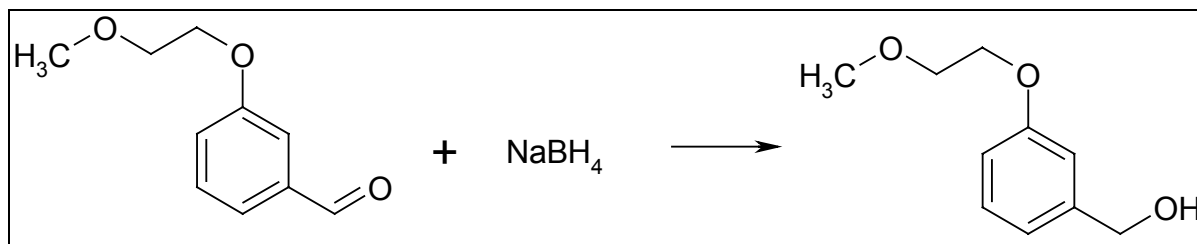
Man erhielt 5,0 g (70%) eines weißen Feststoffes.

¹H-NMR

MeOH, 300 MHz: 3,45 (s, 3 H, Methoxy), 3,75-3,78 (t, 2 H, Spacer), 4,15-4,18 (t, 2 H, Spacer), 7,19-7,22 (t, 1 H, C2-Aromat), 7,39-7,68 (m, 3 H, Aromaten), 9,95 (s, 1 H, Aldehyd)

¹³C-NMR

MeOH, 50 MHz: 57,6 (Methoxy), 66,1 (C2-Spacer), 69,8 (C1-Spacer), 114,2 (C2-Aromat), 118,9 (C4-Aromat), 121,1 (C6-Aromat), 128,9 (C5-Aromat), 136,3 (C1-Aromat), 159,3 (C3-Aromat), 192,0 (Aldehyd)

6.2.20 Synthese von 3-(2-Methoxy-ethylether)-benzylalkohol

In 25 ml abs. Methanol und 25 ml abs. THF wurden 4,0 g (22 mmol) des Benzylaldehyds gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur gab man vorsichtig und langsam 2,0 g (52 mmol) Natriumborhydrid hinzu und rührte 30 min bei 0°C. Anschließend ließ man die Reaktion auf RT erwärmen und rührte weitere 2 h.

Durch Zugabe von 1 n Salzsäure wurde die Reaktion beendet. Der pH-Wert der Lösung wurde auf etwa 5 eingestellt. Im Scheidetrichter wurde die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Hexan umkristallisiert.

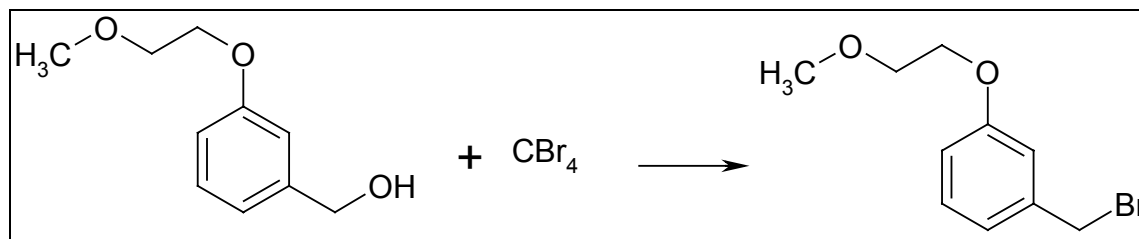
Man erhielt 3,5 g (87%) eines schwach gelben Feststoffes.

¹H-NMR

MeOH, 300 MHz: 3,33 (s, 3 H, Methoxy), 3,61-3,63 (t, 2 H, Spacer), 4,03-4,05 (t, 2 H, Spacer), 4,37-4,39 (d, 2 H, Benzyl), 6,84-6,87 (d, 2 H, C3 + C5-Aromat), 7,17-7,20 (d, 2 H, C6 + C2-Aromat).

¹³C-NMR

MeOH, 50 MHz: 58,1 (Methoxy), 62,5 (Alkohol), 66,8 (C2-Spacer), 70,4 (C1-Spacer), 113,9 (C3 + C5-Aromat), 127,9 (C2 + C6-Aromat), 134,6 (C1-Aromat), 157,3 (C4-Aromat).

6.2.21 Synthese von 3-(2-Methoxy-ethylether)-benzylbromid

In 40 ml abs. DCM wurden 3,5 g (20 mmol) des Benzylalkohols gelöst. Zu dieser Lösung gab man 5,0 g (20 mmol) Triphenylphosphin und kühlte die Reaktion auf 0°C. Bei dieser Temperatur gab in drei Portion insgesamt 6,7 (20 mmol) Tetrabromkohlenstoff zu und rührte die Reaktion 30 min bei 0°C. Anschließend ließ man die Lösung auf RT erwärmen und rührte weitere 4h bei RT. Indem man 10 ml Wasser in den Kolben gab, beendete man die Reaktion. Die beiden Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt, wobei die wässrige Phase mehrfach mit DCM gewaschen wurde. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Hexan : Ethylacetat (2:1) gereinigt. Man erhielt 1,7 g (35%) eines weißen Feststoffes.

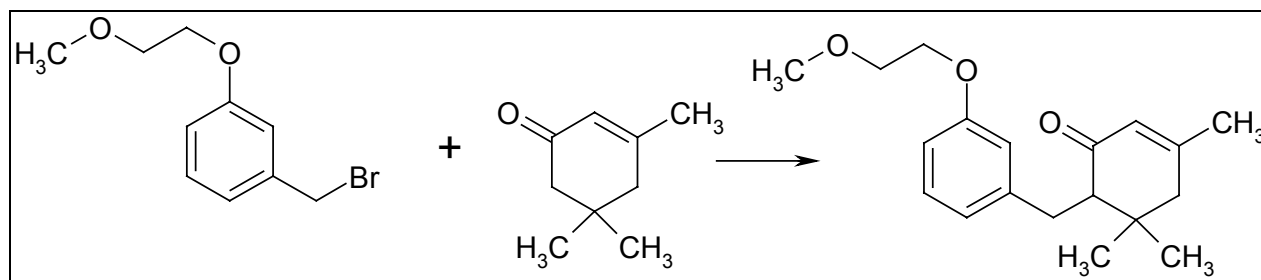
¹H-NMR

MeOH, 300 MHz: 3,44 (s, 3 H, Methoxy), 3,72-3,76 (t, 2 H, Spacer), 4,09-4,12 (t, 2 H, Spacer), 4,44 (s, 2 H, Benzyl), 6,88-6,91 (d, 2 H, Aromat), 7,25-7,27 (d, 2 H, Aromat).

¹³C-NMR

MeOH, 50 MHz: 39,9 (Benzylmethylen), 59,2 (Methoxy), 67,3 (C2-Spacer), 70,9 (C1-Spacer), 114,8 (C3 + C5-Aromat), 130,1 (C6 + C2 Aromat), 130,4 (C1-Aromat), 158,8 (C4-Aromat).

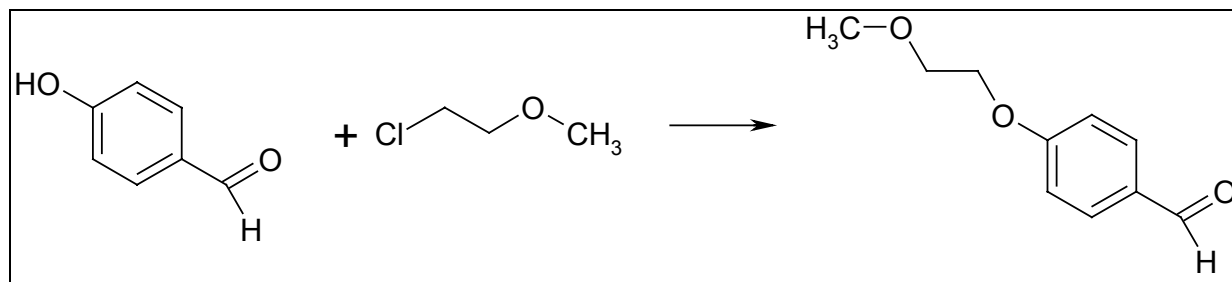
6.2.22 Synthese von 3-(2-Methoxy-ethylether)-1-(4,6,6-trimethyl-2-carboxy-cyclohex-3-enylmethyl)-benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 0,6 ml (6 mmol) Diisopropylamin in 30 ml abs. THF gelöst und auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur gab man 4 ml (6 mmol) einer Butyllithium-Lösung zu und rührte 20 min bei dieser Temperatur. Nach dieser Zeit tropfte man 0,65 ml (6 mmol) Isophoron zur Reaktion und rührte weitere 20 min bei -78°C . Nach dieser Zeit wurde das Kühlbad entfernt, erreichte die Reaktion eine Temperatur von etwa -10°C , tropfte man 1,0 g (6 mmol) des Benzylbromides in 5 ml abs. THF hinzu. Die Lösung rührte noch weitere 3 h bei RT.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von etwas Wasser abgebrochen. Im Scheidetrichter wurden die beiden Flüssigkeitsphasen getrennt und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel entfernt.

Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule mit den Eluenten Hexan : Ethylacetat (2:1) geführt.

6.2.23 Synthese von 4-(2-Methoxy.ethylether)-benzylaldehyd

In 30 ml abs. DMF wurden 5,0 g (40 mmol) 4-Hydroxy-benzylaldehyd gelöst. Zur Lösung gab man 5,52 g (40 mmol) Kaliumcarbonat und 6,64 g (40 mmol) Kaliumiodid sowie 3,7 ml (40 mmol) 1-Chloro-2-Methoxy-ethan und erhitzte auf 150°C. Die Reaktion wurde 5 h unter Rückfluss gekocht.

Nach dem Abkühlen des Kolben wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Wasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde im Scheidetrichter mehrfach mit DCM extrahiert. Das in der organische Phase vorliegende DMF wurde mit Wasser ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert.

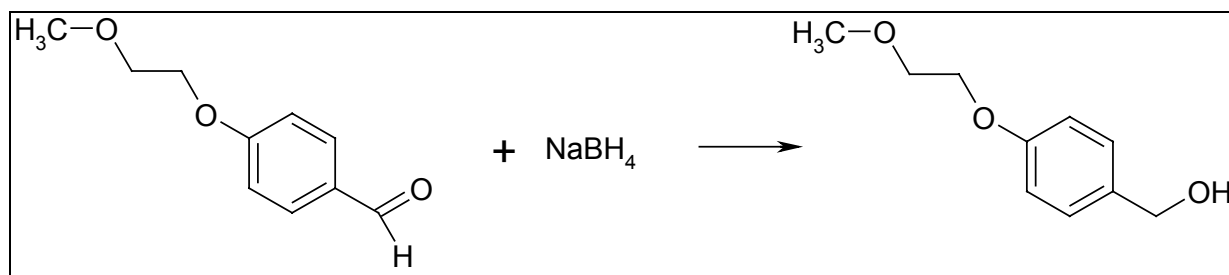
Zur Reinigung wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit den Elementen Hexan : Ethylacetat (2:1) aufgearbeitet. Man erhielt 3,7 g (51%) eines weißen Feststoffes.

¹H-NMR

MeOH, 300 MHz: 3,45 (s, 3 H, Methoxy), 3,77-3,78 (t, 2 H, Spacer), 4,18-4,20 (t, 2 H, Spacer), 7,00-7,03 (d, 2 H, C2 + C6-Aromat), 7,80-7,83 (d, 2 H, C3 + C5-Aromat), 9,87 (s, 1 H, Aldehyd).

¹³C-NMR

MeOH, 50 MHz: 59,2 (Methoxy), 67,5 (C2-Spacer), 70,7 (C1-Spacer), 114,8 (C3 + C5-Aromat), 130,0 (C2 + C6-Aromat), 131,9 (C1-Aromat), 163,7 (C4-Aromat), 190,8 (Aldehyd).

6.2.24 Synthese von 4-(2Methoxy-ethylether)-benzylalkohol

In 25 ml abs. Methanol und 25 ml abs. THF wurden 2,0 g (11 mmol) des Benzylaldehyds gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur gab man langsam 1,5 g (40 mmol) Natriumborhydrid zu und rührte 30 min bei dieser Temperatur. Anschließend wurde das Kühlbad entfernt und die Reaktion weitere 2 h bei RT gerührt.

Durch Zugabe 1 n Salzsäure wurde die Reaktion beendet. Das Hinzufügen von Salzsäure erfolgte solange, bis die Lösung einen pH-Wert von etwa 5 besaß. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Produktphase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel entfernte man im Vakuum.

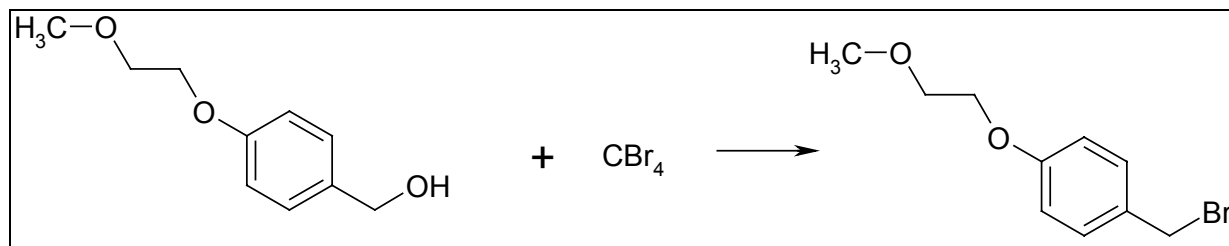
Das Rohprodukt wurde aus Hexan umkristallisiert. Man erhielt 1,9 g (95%) eines schwach bräunlichen Feststoffes.

 $^1\text{H-NMR}$

MeOH, 300 MHz: 3,33 (s, 3 H, Methoxy), 3,61-3,63 (t, 2 H, Spacer), 4,03-4,05 (t, 2 H, Spacer), 4,37-4,39 (d, 2 H, Benzyl), 6,84-6,87 (d, 2 H, C3 + C5-Aromat), 7,17-7,20 (d, 2 H, C6 + C2-Aromat).

 $^{13}\text{C-NMR}$

MeOH, 50 MHz: 58,1 (Methoxy), 62,5 (Alkohol), 66,8 (Spacer C2-Spacer), 70,4 (C1-Spacer), 113,9 (C3 + C5-Aromat), 127,9 (C2 + C6-Aromat), 134,6 (C1-Aromat), 157,3 (C4-Aromat).

6.2.25 Synthese von 4-(2-Methoxy-ethylether)-benzylbromid

In 30 ml abs. DCM wurden 1,9 g (11 mmol) des Benzylalkohols und 2,7 g (11 mmol) Triphenylphosphin gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden in 3 Portionen insgesamt 3,6 g (11 mmol) Tetrabromkohlenstoff zugefügt. Anschließend ließ man die Reaktion langsam auf RT erwärmen und rührte weitere 4 h bei RT.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Wasser abgebrochen. Im Schütteltrichter wurden die Phasen getrennt und die wässrige Flüssigkeitsphase 3 mal mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule mit den Laufmitteln Hexan : Ethylacetat (2:1) geführt. Man erhielt 820 mg (33%) eines leicht bräunlichen Feststoffes.

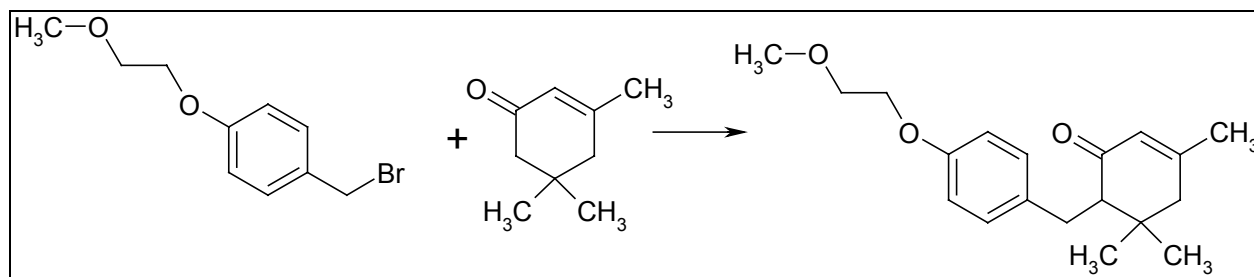
¹H-NMR

MeOH, 300 MHz: 3,44 (s, 3 H, Methoxy), 3,72-3,76 (t, 2 H, Spacer), 4,09-4,12 (t, 2 H, Spacer), 4,44 (s, 2 H, Benzyl), 6,88-6,91 (d, 2 H, Aromat), 7,25-7,27 (d, 2 H, Aromat).

¹³C-NMR

MeOH, 50 MHz: 39,9 (Benzylmethylen), 59,2 (Methoxy), 67,3 (C2-Spacer), 70,9 (C1-Spacer), 114,8 (C3 + C5-Aromat), 130,1 (C6 + C2 Aromat), 130,4 (C1-Aromat), 158,8 (C4-Aromat).

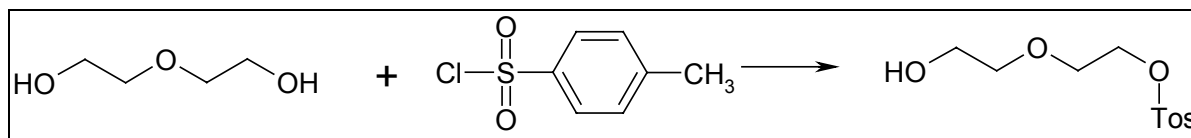
6.2.26 Synthese von 4-(2-Methoxy-ethylether)-1-(4,6,6-trimethyl-2-carboxy-cyclohex-3-enylmethyl)-benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 0,50 ml (6 mmol) Diisopropylamin in 30 ml abs. THF gelöst und auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur gab man 2 ml (6 mmol) einer Butyllithium-Lösung zu und rührte 20 min bei dieser Temperatur. Nach dieser Zeit tropfte man 0,45 ml (3 mmol) Isophoron zur Reaktion und rührte weitere 20 min bei -78°C . Nach dieser Zeit wurde das Kühlbad entfernt, erreichte die Reaktion eine Temperatur von etwa -10°C , tropfte man 800 mg (3 mmol) des Benzylbromides in 5 ml abs. THF hinzu. Die Lösung rührte noch weitere 3 h bei RT.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von etwas Wasser abgebrochen. Im Scheidetrichter wurden die beiden Flüssigkeitsphasen getrennt und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel entfernt.

Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule mit den Eluenten Hexan : Ethylacetat (2:1) geführt.

6.2.27 Synthese von Toluol-4-sulfonsäure-2-(2-Hydroxy-ethoxy)ethylester

In einem 500ml Kolben wurden 8.49g (80 mmol) des Diols in 80 ml Methylenchlorid gelöst. Zu dieser Lösung wurden nun 8.1g (80 mmol) Triethylamin und 122 mg DMAP zugefügt. Das Gemisch kühlte man auf 0°C und tropfte 3.81g (20 mmol) das Tosylchlorid in 80 ml Methylenchlorid zu. Nach vollständiger Zugabe des Tosylchlorids ließ man noch 2.5 h bei RT rühren.

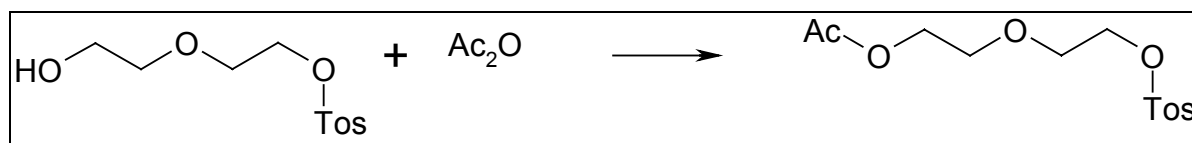
Man stellte sich gesättigter KHCO₃ Lösung her und wusch damit 3 mal die Reaktionslösung. Die wässrige Phase extrahierte man in 3 Portionen mit Methylenchlorid und trocknete die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄. Man filtrierte ab und entfernte das Lösungsmittel mit dem Rotationsverdampfer. Die Reinigung erfolgte an Kieselgel (Hexan : Ethylacetat = 1:2). das Produkt ist ein klares Öl, von dem man 3.18g erhielt (61%).

¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 1,91 (s, 1 H, Alkohol), 2,46 (s, 3H, Methyl), 3,53 - 3,56 (t, 2 H, Hydroxy-CH₂), 3,66 - 3,72 (m, 4 H, 2 Methylen-Gruppen), 4,19 - 4,22 (t, 2H, Sulfon-CH₂) 7,35 - 7,35 (d, 2 H, C2+C6 Aromat), 7,80 - 7,83 (d, 2H C3+C5 Aromat)

¹³C-NMR

CDCl₃, 50 Mhz: 21,6 (Methyl-C), 61,6 (C1-Ethyl), 68,5 (C2-Ethyl), 69,1 (C1-Ethoxy), 72,4 (C2'-Ethoxy), 127,9 (C3 + C5 Aromat), 129,8 (C2 + C6 Aromat), 133,0 (C4-Aromat), 144,9 (C1-Aromat).

6.2.28 Synthese von Toluol-4-sulfonsäure-2-(2-Acetyl-ethoxy)ethylester

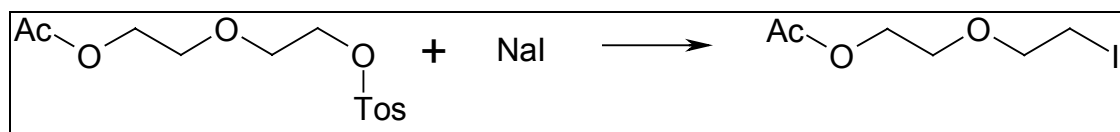
Man löste 3,0 g (11 mmol) Spacer in 25 ml Dichlormethan und gab 1,5 ml (11 mmol) Triethylamin und 100 mg 4-DMAP zu. Die Lösung wurde im Eisbad gekühlt. Man tropfte innerhalb 1 h 27 ml (22 mmol) Acetanhydrid zu und ließ über Nacht rühren. Man wusch die Reaktionslösung 2 mal mit 100 ml ges. NaHCO_3 -Lösung. Die wässrige Phase wurde mit 40 ml DCM extrahiert. Im Vakuum wurde das Lösungsmittel der vereinigten Phase entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit Cyclohexan und Essigester (1:1). Man erhielt 1,0 g (30%) eines gelblichen Öls.

 ^1H -NMR

CDCl_3 , 300MHz: 2,07 (s, 3H, Methyl), 2,45 (s, 3H, Methyl-Ar), 3,61-3,65 (t, 2H, C2'-Ethoxy), 3,68-3,71 (t, 2 H, C1-Atom), 4,13-4,22 (m, 4 H, Methylen-Gruppen), 7,34-7,36 (d, 2H, C2 + C6 Aromat), 7,82-7,95 (d, 2H, C3 + C5 Aromat).

 ^{13}C -NMR

CDCl_3 , 50 Mhz: 21,6 (Methyl-C), 60,3 (Acetat), 61,6 (C1-Ethyl), 68,5 (C2-Ethyl), 69,1 (C1-Ethoxy), 72,4 (C2'-Ethoxy), 127,9 (C3 + C5 Aromat), 129,8 (C2 + C6 Aromat), 133,0 (C4-Aromat), 144,9 (C1-Aromat), 170,6 (Carboxyl).

6.2.29 Synthese von Iodo-2-(2-Acetyl-ethoxy)ethylester

Das Tosylat (1,0 g = 3 mmol) wurde in 10 ml Aceton gelöst und man fügte 500 mg (3 mmol) Natriumiodid hinzu. Die Lösung wurde 24 h bei RT gerührt.

Zur Aufarbeitung entfernte man das Aceton am Rotationsverdampfer. Das Rohöl wurde säulenchromatographisch mit den Eluenten Hexan : Ethylacetat (1:1) aufgearbeitet. Man erhielt 700 mg (82%) eines klaren Öls.

¹H-NMR:

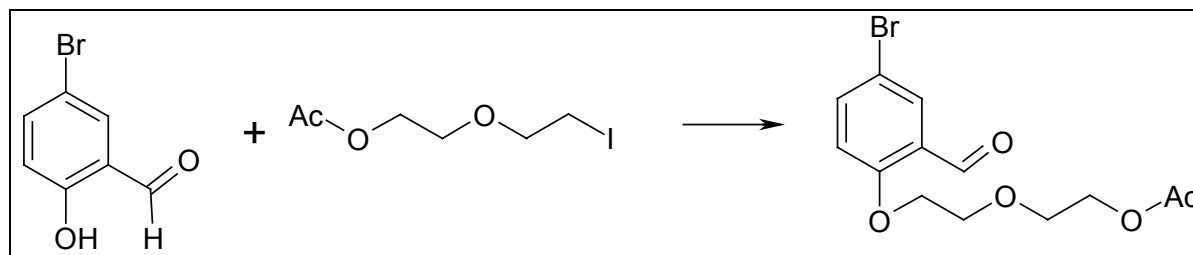
CDCl₃, 300 MHz: 2,10 (s, 3H, CH₃-Gruppe), 3,24-3,28 (t, 2H, C2-Atom der Ethoxy-Gruppe, J = 4), 3,69-3,78 (4H, m, CH₂-Gruppen), 4,22-4,25 (t, 2H, CH₂-I, J = 2,8).

¹³C-NMR:

CDCl₃, 50 MHz: 2,4 (C-I), 20,9 (Methyl-Gruppe), 63,3 (C2-Atom), 68,6 (C1'-Atom), 71,7 (C2'-Atom), 170,9 (Carbonyl).

Elementaranalyse

	ber.	gef.
C	26,3	26,57
H	4,05	4,29
N	0	0

6.2.30 Synthese von 5-Brom-2-(2-Acetyl-ethoxy-ethylether)-benzylaldehyd

In 10 ml DMF wurden 600 mg (3 mmol) des Benzylbromids sowie 400 mg (3 mmol) Kaliumcarbonat, 500 mg (3 mmol) Kaliumiodid und 890 mg des acetylierten Spacers gelöst. Die Suspension erhitze man für 5 h auf 150 °C und rührte intensiv. Man ließ den Kolben abkühlen und stoppte die Reaktion durch Zutropfen von 10 ml Wasser. Die wässrige Phase wurde im Scheidetrichter mehrfach mit DCM extrahiert. Das überschüssige DMF in der organischen Phase wurde mit Wasser ausgewaschen. Die organische Produktphase trocknete man über Na₂SO₄ und entfernte im Vakuum das Lösungsmittel.

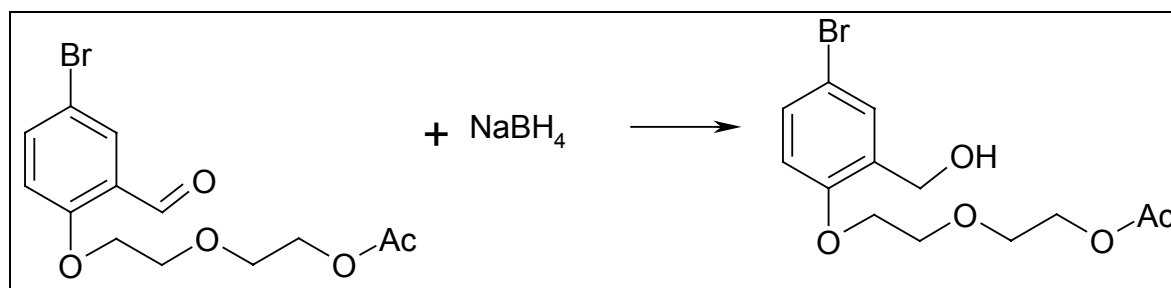
Die Reinigung erfolgte an Kieselgel mit den Laufmitteln Hexan : Ethylacetat (2 : 1). Man erhielt 610 mg (61%) eines braun-weißen Feststoffes.

¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 2,08 (s, 3 H, Methyl), 3,75 - 3,78 (t, 2 H, C1-Ethyl), 3,89 - 3,92 (t, 2 H, C2'-Ethoxy), 4,23 - 4,26 (m, 4 H, 2 Methylen-Gruppen), 6,90 - 6,93 (d, 1 H, C3-Aromat), 7,60 - 7,64 (d, 1 H, C4-Aromat), 7,93 (s, 1 H, C6 Aromat).

¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 20,8 (Methyl), 63,2 (C1-Ethyl), 68,5 (C2-Ethyl), 69,2 (C1'-Ethoxy), 69,4 (C2'-Ethoxy), 113,8 (C5 Aromat), 114,9 (C3 Aromat), 126,4 (C6 Aromat), 130,9 (C1 Aromat), 138,1 (C4 Aromat), 160,0 (C2 Aromat), 170,9 (Carbonyl), 188,2 (Aldehyd)

6.2.31 Synthese von 5-Brom-2-(2-Acetyl-ethoxy-ethylether)-benzylalkohol

Man löste 610 mg (2 mmol) des Benzaldehyds in 10 ml abs. Methanol und 10 ml abs. THF und kühlte auf 0°C. Bei dieser Temperatur gab man vorsichtig 300 mg (8 mmol) Natriumborhydrid zu und rührte 30 min bei 0°C. Anschließend wurde der Kolben langsam auf RT erwärmt und rührte weitere 2 h.

Die Reaktion wurde durch Zugabe 1 n Salzsäure gestoppt. Dabei wurde die Lösung auf einen pH-Wert von etwa 5 eingestellt. Im Scheidetrichter wurde die wässrige Phase mit mehrfach Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Hexan : Ethylacetat (1:1) aufgearbeitet. Man erhielt 500 mg (83%) eines leicht bräunlichen Feststoffes.

¹H-NMR

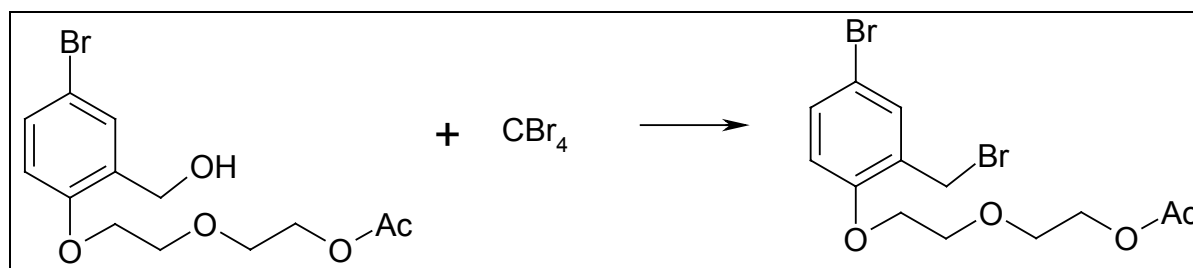
Methanol, 300 MHz: 2,07 (s, 3 H, Methyl), 3,70-3,75 (t, 2 H, Spacer, J=12 Hz), 3,90-3,94 (t, 2 H, Spacer, J=10 Hz), 4,21-4,26 (m, 4 H, Spacer), 6,91-6,94 (d, 1 H, C3-Aromat, J= 9 Hz), 7,65-7,69 (d, 1 H, C4-Aromat, J=10 Hz), 8,01 (s, 1 H, C6-Aromat)

¹³C-NMR

Methanol, 50 MHz: 21,4 (Methyl), 54,3 (Alkohol), 65,3 (Spacer), 68,7 (Spacer), 70,4 (Spacer), 70,6 (Spacer), 114,7 (C5-Aromat), 115,3 (C3-Aromat), 124,3 (C6-Aromat), 130,9 (C1-Aromat), 140,2 (C4-Aromat), 163,1 (C2-Aromat), 171,2 (Carboxyl)

Smp: 78-80 °C

MS: 332, 334 [M⁺], 291, 289 [M -Ac], 254 [M -Br], 209 [M -Br -Ac]

6.2.32 Synthese von 5-Brom-2-(2-Acetyl-ethoxy-ethylether)-benzylbromid

In 20 ml abs. DCM wurden 500 mg (1,5 mmol) des Benzylalkohols und 500 mg (2 mmol) Triphenylphosphin gelöst. Die Lösung kühlte man auf 0°C und gab in drei Portion insgesamt 600 mg (2 mmol) Tetrabromkohlenstoff hinzu. Die Reaktion wurde langsam auf RT erwärmt und rührte weitere 4 h bei dieser Temperatur.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Wasser abgebrochen. Im Scheidetrichter wurden die beiden Flüssigkeitsphasen getrennt und die wässrige Phase 3 mal mit DCM ausgeschüttelt. Die gesammelten organischen Produktphasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel entfernt.

Die Reinigung erfolgte an Kieselgel mit den Eluenten Hexan : Ethylacetat (2:1). Man erhielt 220 mg (37%) eines braunen Feststoffes.

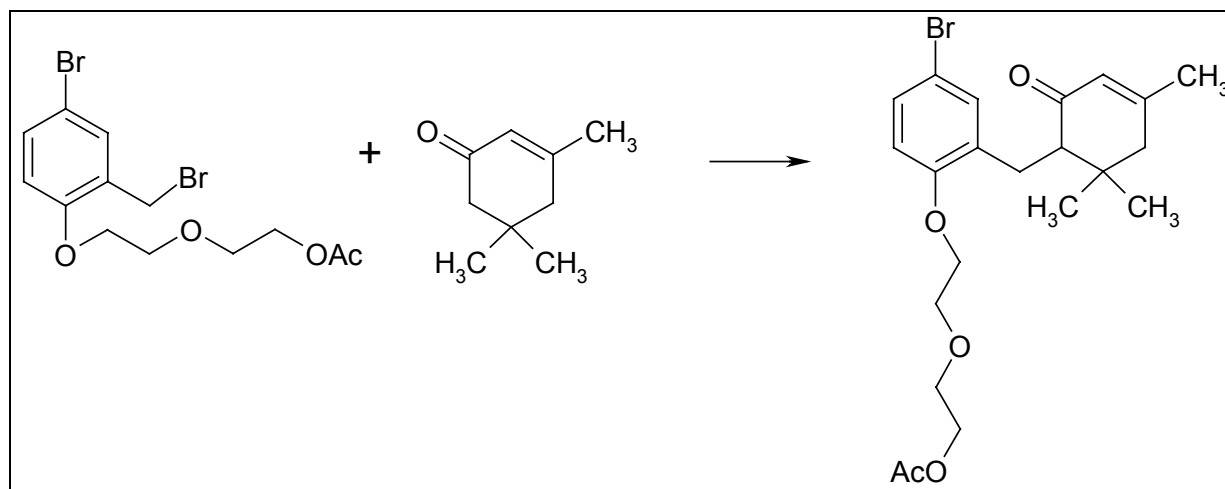
¹H-NMR

CDCl₃, 300 MHz: 2,03 (s, 3 H, Methyl), 3,76-3,81 (t, 2 H, Spacer, J=4 Hz), 3,94-3,99 (t, 2 H, Spacer, J=4 Hz), 4,22-4,26 (m, 4 H, Spacer), 6,84-6,88 (d, 1 H, C3-Aromat, J=10 Hz), 7,60-7,65 (d, 1 H, C4-Aromat, J=10Hz), 7,99 (s, 1 H, C6-Aromat).

¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 23,4 (Methyl), 29,3 (Benzylbromid), 63,4 (Spacer), 67,1 (Spacer), 71,2 (Spacer), 71,6 (Spacer), 112,7 (C5-Aromat), 114,9 (C3-Aromat), 122,1 (C6-Aromat), 131,3 (C1-Aromat), 142,2 (C4-Aromat), 163,9 (C2-Aromat) 173,4 (Carboxyl)

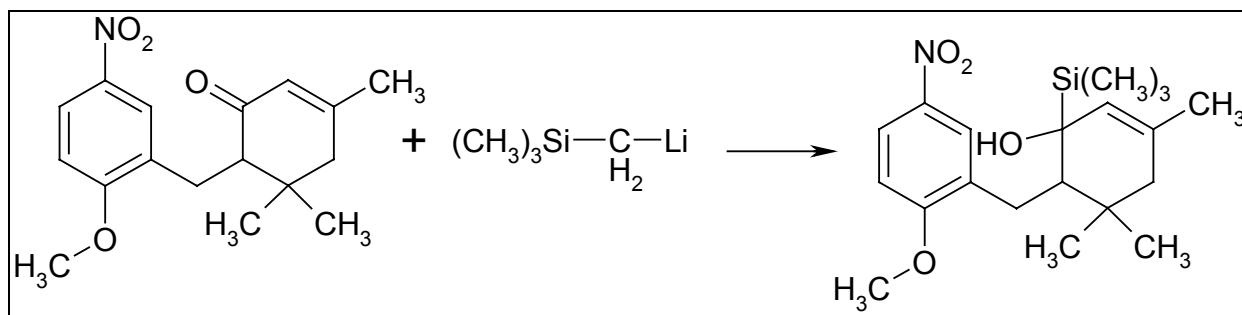
6.2.33 Synthese von 2-(2'-Acetyl-ethoxy-ethylether)-5-Brom-1-(4,6,6-trimethyl-2-carboxy-cyclohex-3-enylmethyl)benzen



Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden 80 µl (0,5 mmol) Diisopropylamin in 5 ml abs. THF vorgelegt und auf - 78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur tropfte man 0,3 ml (0,5 mmol) einer Butyllithium-Lösung hinzu. Die Lösung wurde 20 min bei -78°C gerührt, anschließend gab man 70 µl (0,5 mmol) Isophoron zu und rührte weitere 20 min. Nach dieser Zeit entfernte man das Kühlbad, sobald der Kolben etwa -10°C erreichte, tropfte man 220 mg (0,5 mmol) des Benzylbromides in 2 ml abs. THF zu. Die Reaktion rührte 4 h bei Raumtemperatur.

Durch Zugabe von 10 ml Wasser wurde die Reaktion unterbrochen. Im Scheidetrichter extrahierte man mit DCM mehrfach die wässrige Phase. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

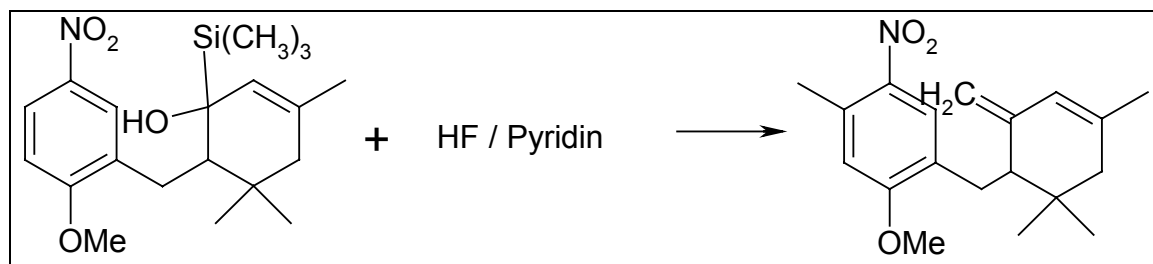
Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit den Laufmittel Hexan : Ethylacetat (2:1) aufgearbeitet.

6.2.34 Synthese von 4-Methoxy-1-nitro-3-(4,6,6-trimethyl-2-hydroxy-2-trimethylsilyl-cyclohex-3-enylmethyl)benzen

Es wurden 1,0 g (3 mmol) des Ketons in 20 ml abs. THF gelöst und auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur gab man 1,0 ml (3 mmol) einer Trimethyl-silylmethyl-lithium-Lösung. Die Lösung ließ man langsam auf RT erwärmen und rührte 1 h bei Raumtemperatur weiter.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von verd. NH_4Cl -Lösung abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

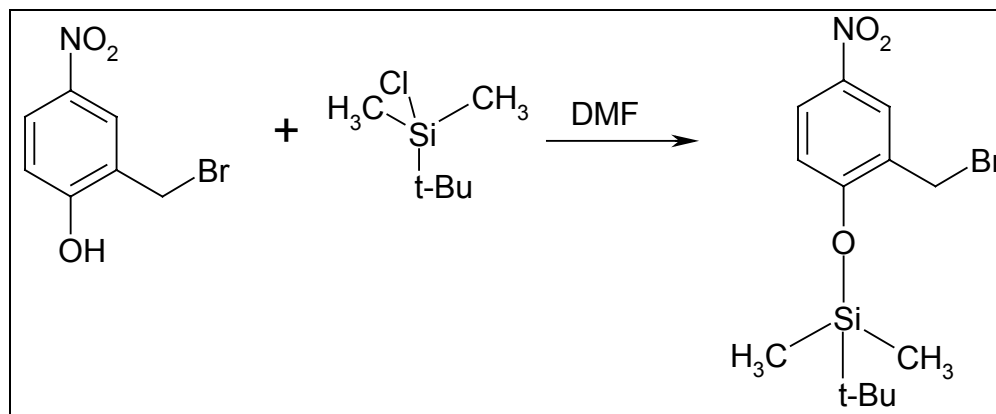
Das Rohprodukt wurde sofort im nächsten Experiment eingesetzt.

6.2.35 Synthese von 4-Methoxy-1-nitro-3-(4,6,6-trimethyl-2-methylen-cyclohex-3-enylmethyl)benzen

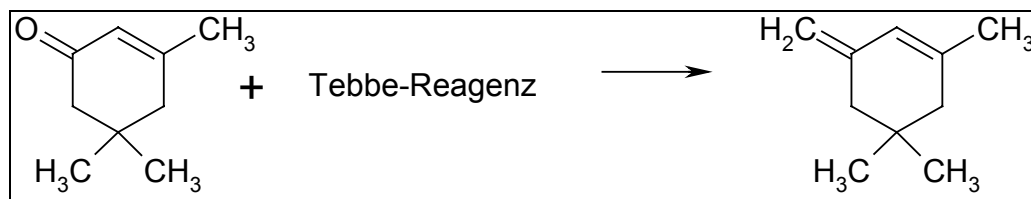
Das Rohprodukt aus dem Experiment 6.2.38 wurde in 20 ml THF gelöst. Zu dieser Lösung gab man einen großen Überschuss des Flußsäure-Pyridin Lösung zu. Die Reaktion wurde 16 h bei RT gerührt.

Nach dieser Zeit wurde der Ansatz mit 40 ml Ethylacetat verdünnt. Im Scheidetrichter wird die Reaktion mit 20 ml 1M NaHSO₄-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukte wurde säulenchromatographisch mit Hexan : Ethylacetat (2:1) gereinigt. Man erhielt nur geringe Mengen eines unerwünschten Nebenproduktes.

6.2.36 Synthese von 5-Nitro-2-(t-Butyldimethylsilylether)-Benzylbromid

Es wurden 2,0 g (9 mmol) 2-Hydroxy-5-Nitro-Benzylbromid und eine Spatelspitze Imidazol in 25 ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung gab man unter ständigen rühren 1,4 g (9 mmol) der Schutzgruppe zu. Die Reaktion ließ man über Nacht bei RT rühren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 ml NH₄Cl Lösung unterbrochen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat gewaschen und die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Zur Reinigung führte man das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule mit den Eluenten Hexan : Ethylacetat (1:1).

6.2.37 Synthese von 4,4,6-Trimethyl-2-methylen-cyclohexen

Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden in einem 50 ml Zweihals-Kolben 300 ml (2 mmol) Isophoron in 25 ml abs. THF vorgelegt und mit Eis auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur tropfte man langsam 2,5 ml einer 0,5 molaren Lösung von [(μ-chloro-μ-methylen)-[bis(cyclopentadienyl)titan]dimethyl-aluminium (Tebbe-Reagenz) zu. Die Reaktionslösung ließ man auf RT erwärmen und rührt weitere 4 h. Nach dieser Zeit wurde die Lösung wieder auf 0°C gekühlt und die Reaktion mit 5 ml verd. Natronlauge abgebrochen. Man überführte das Reaktionsgemisch in ein Scheidetrichter und extrahierte die wässrige Phase mit Ethylacetat. Die vereinigte organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule mit dem Laufmittel Hexan : Ethylacetat (4:1) geführt. Man erhielt 51 mg (17 %) eines gelblichen Öls.

¹H-NMR

CDCl₃, 200 MHz: 0,92 (s, 6 H, C4-Methylgruppen), 1,79 (s, 3 H, C6-Methylgruppe), 1,97-2,03 (m, 4 H, Methylengruppen im Ring), 3,92 (s, 1 H, exocyclische Methylengruppe), 4,05 (s, 1 H, exocyclische Methylengruppe), 5,63 (s, 1 H, Vinyl)

¹³C-NMR

CDCl₃, 50 MHz: 24,2 (Methyl), 28,0 (Methyl), 33,2 (Methyl), 44,9 (Methylen), 50,5 (Methylen), 104,3 (exocyclische Methylen), 125,1 (CH-Vinyl), 130,7 (C2-Isophoron), 159,9 (quart. Vinyl).

7. Literaturverzeichnis

1. O. Raab, *Zeitschrift für Biologie*, **1900** (39) 524-526
2. H. von Tappeiner, A. Jesionek, *Müncher medizinische Wochenschrift*, **1903** (47) 2042 - 2044
3. H. von Tappeiner, A. Jodlbauer, *Deutsches Archiv der klinischen Medizin*, **1904** (80) 427-487
4. Policard, *CR Societe Biolo*, **1924** (91) 1423-1424
5. H. Auler, G. Banzer, *Zeitschrift für Krebsforschung*, **1942** (53) 65-68
6. T.J. Dougherty et al., *Cancer Research*, **1978** (38) 2628-2635
7. G. Jori, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **1996** (36) 87-93
8. R. Bonnett, *Chemical Society reviews*, **1995**, 19-33
9. R.W. Boyle, D. Dolphin, *Photochemistry and Photobiology*, **1996** (64) 469-485
10. E. Reddi, G. LoCastro, R. Biolo, G. Jori, *British Journal of Cancer*, **1987** (56) 597-600
11. R.W. Boyle, J. Rousseau, S.V. Kudrevich, M.O.K. Obochi, J.E. van Lier, *British Journal of Cancer*, **1996**
12. D. Whorle, M. Shopova, S. Muller, A.D. Milev, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **1993** (21) 155-165
13. W.-S. Chan, J.F. Marshall, R. Svensen, J. Bedwell, *Cancer Research*, **1990** (50) 4533-4538
14. C.J. Gomer, A. Ferrario, *Cancer Research*, **1990** (50) 3985-3990
15. Photofrin Basisdokumentation, *Ipsen Pharma*, August **1997**
16. L.J. Scott, K.L. Goa, *Drugs & Aging*, **2000** (16) 139-146
17. B.A. Allison, P.H. Pritchard, J.G. Levy, *British Journal of Cancer*, **1994** (69) 833-839
18. A.M. Richter, E. Waterfield, A.K. Jain, *British Journal of Cancer*, **1991** (63) 87-93
19. *Archiv of Ophthalmology*, **1999** (117), 1329-45
20. J.L. Sessler, R.A. Miller, *Biochemical Pharmacology*, **2000** (59), 733-739
21. B. Timmerman, P. Carde, C. Koprowski, et al., *International Journal of Radiation Oncology Biol Phys*, **1998** (42) Suppl 198
22. K.W. Woodburn, Q. Fan, D. Kessel, et al., *Journal of clinical laser medicinal surgery*, **1996** (14) 343-348

23. Q. Peng K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, J.M. Nesland, *Photochemistry and Photobiology*, **1997** (65) 235-251
24. K. Kalka, H. Merk, H. Mukhtar, *Journal of the American Academy of Dermatology*, **2000** (42) 389-416
25. L. Streyer, *Biochemie*, VCH Verlag, **1985**
26. M. Ochsner, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **1997** (39) 1-18
27. K. Weishaupt, C.J. Gomer, T. Dougherty, *Cancer Research*, **1976** (36) 2326-2329
28. Rosenkranz, *Immunology and Cell Biology*, **2000** (78) 452-464
29. C.J. Gomer, M. Luna, A. Ferrario, S. Wong A. Fisher, N. Rucker, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, **1996** (5) 315-321
30. K. Berg, J. Moan, *Photochemistry and Photobiology*, **1997** (65) 403-409
31. A.C. Moor, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **2000** (57) 1-13
32. D. Kessel, Y. Luo, *Cell Death differ.*, **1999** (6) 28-35
33. D.J. Granville, C.M. Carthy, H. Jiang, G.C. Shore, B.M. McManus, *FEBS Letters*, **1998** (437) 5-10
34. A.G. Porter, R.U. Janicke, *Cell Death Differ.*, **1999** (6) 99-104
35. W.G. Zhang, L.P. Ma, S.W. Wang, Z.Y. Zhang, G.D. Cao, *Photochemistry and Photobiology*, **1996** (64) 845-852
36. T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B. Henderson, *Journal of the national cancer institut*, **1998** (90) 889-903
37. E. Reddi, C. Zhou, R. Biolo, E. Menegaldo, G. Jori, *Lasers Medicinal science*, **1990** (61) 407-411
38. E. Reddi, S. Cernuschi, R. Biolo, G. Jori, *Lasers Medicinal science*, **1990** (5) 339-343
39. E. Reddi, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **1997** (37) 189-195
40. A.R. Oseroff et al., *Proceedings of the national academy of science*, **1986** (83) 8744-8748
41. T.I. Ghose, A.H. Blair, P.N. Kulkarni, *Meth. Enzymol*, **1983** (93) 280-338
42. T. Hasan, A. Lin, D. Yamush, A. Oseroff, M. Yamuah, *Journal of controlled release*, **1989** (10) 107-117
43. D. A. Bellnier, T.J. Dougherty, *Photochemistry and Photobiology*, **1982** (36) 43-47

44. M.R. Hamblin, E.L. Newman, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **1994** (26) 45-56
45. Gusens, P. de Witte, *International journal of Oncology*, **1998** (13) 1171-1177
46. T.V. Akhlylina et al., *Cancer Research*, **1995** (55) 1014-1019
47. D.A. James et al, *Bioorganic and Medicinal chemistry Letters*, **1999** (9) 2379-2384
48. J.W. Bats, G. Haake, A. Meier, F-P. Montforts, G. Scheurich, *Liebigs Annalen*, **1995**, 1617-1631
49. E. Craig, *Crit. Rev. Biochem.*, **1985** (18) 239
50. G. Krauss, *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, Wiley-VCH, Weinheim **1997**
51. M.A. Carson-Jurica, W.T. Schrader, B.W. O'Malley, *Endocrine Reviews* **1990** (11) 201-220
52. U. Fuhrmann, H. Hess-Stumpp, A. Cleve, et al. *Journal of medicinal chemistry*, **2000**, (43) 5010-5016
53. M.A. Rossing, Estrogens, *Progestins and their Antagonists*, Vol. 1, Ed. E.J. Pavlik, Birkhäuser, Boston, **1996**, 99-113
54. H.E. Högberg, R.H. Thomson, T.J. King; *Journal of the chemical society perkin*, **1976**, 1696-1701
55. L. Zhi, C.M. Tegley, B. Pio, et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2000**, (10) 415-418
56. M. Dukes, B.J. Furr, L.R. Hughes, H. Tucker, J.R. Woodburn, *Steroids*, **2000**, (65), 725-731
57. S.L. Marcus, *Proceedings of the IEEE*, **1992** (80) 869-889
58. V.T. DeVita, S. Hellman, S.A. Rosenberg, 290 contributors, *Cancer: principles and practice of oncology*, 5th Edition, Lippincott-Raven Publishers, **1997**
59. J.S. McCaughan, T.E. Williams, B.H. Bethel, *Lasers in surgery medicine* **1986** (6) 336-345
60. M. Dugan, S. Marcus, K. Parker, O. Sachdev et al., *Lasers Medicinal Surgery*, **1989** (9) Suppl.2
61. B. Hellwig, *Deutsche Apotheker Zeitung*, **2001** (141) 1522-24
62. S.L. Marcus, *Future Directions and Applications in Photodynamic Therapy*, Editor C.J. Gomer, SPIE Press, Bellingham, **1990**, 5-56
63. V.G. Schweitzrer, S. Bologn, *Laryngoscope*, **1993** (103) 699-703

64. Z. Malik, H. Lugaci, *British Journal of Cancer*, **1987** (56) 589-595
65. P.J. Robinson, J.A.S. Carruth, G.M. Fairris, *British Journal of Dermatology*, **1988** (119) 59-61
66. N. Oleinick, A. Antunez, B. Rihner, M. Clay, M. Kenney, *Photochemistry and Photobiology*, **1993** (57) 242-247
67. V. Colussi, D. Feyes, Y-S. Li, J. Mulvihill, J. Kenney, *Photochemistry and Photobiology*, **1998** (67) Suppl. 25S
68. L.G. Hamann, L.J. Farmer, M.G. Johnson, M.E. Goldman, *Annals of the New York Academy of science*, **1995**, 383-388
69. R. Wiechert, G. Neef, *Journal of steroid Biochemistry*, **1987**, (27) 851-858
70. S.E. Gibson, *Bor- und Siliciumverbindungen in der organischen Synthese*, VCH, Weinheim, **1995**
71. D. Oehler, Diplomarbeit, Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt **2000**
72. R. Appel, *Angewandte Chemie*, **1975** (87) 863-873
73. F.N. Tebbe, *Journal of the American chemical society*, **1978** (100), 3611
74. J. Hibino, T. Okazoe, K. Takai, H. Nozaki, *Tetrahedron Letters*, **1985** (45) 5579-5580
75. K. Takai, Y. Hotta, K. Oshima, H. Nozaki, *Tetrahedron Letters*, **1978** (27) 2417-2420
76. R. Morrison, R. Boyd, *Lehrbuch der organischen Chemie*, VCH, 3. Auflage, **1986**
77. M.A. Fox, C.A. Triebel, R. Rogers, *Synthetic Communications*, **1982** (12) 1055-1061
78. R-M Szeimies, D. Jocham, M. Landthaler (Hrsg.), *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*, Blackwell Verlag, Berlin Wien, **2003**

8. Lebenslauf

Name:	Christian Orth
Geburtsdatum:	22.03.1971 in Trier
schulische Ausbildung:	Sep. 1977 - Mai 1981 Grundschule Wiltingen Aug. 1981 - Juni 1990 Max-Planck-Gymnasium Trier
Studium:	Okt. 1990 - Juli. 1997 an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken, Wahlpflichtfach: Instrumentelle Analytik, mit Schwerpunkt auf HPLC und GC bei Prof. Engelhardt Schwerpunktfach: Organische Chemie bei Prof. K. Schank
Diplomarbeit:	Aug. 1997- Feb. 1998 am Institut für Analytik und Radiochemie der Universität Saarbrücken bei Prof. H-P. Beck mit dem Thema: „Entwicklung von Verfahren zur Bestimmung von Pseudohalogenide in der Fließ-Injektions-Analyse“
Promotion:	seit Apr. 1998 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt/Main „Entwicklung und Synthese von steroidrezeptor-bindende Phototherapuetika“.

Präsentationen

„Nichtsteroidale Antiprogestine als Basis für neue PDT-Wirkstoffe“

Ch. Orth, D. Oehler, W.S.L. Strauß, M. Schubert-Zsilavecz

15. Jahrestagung der ÖPhG in Innsbruck

„Steroid Receptor binding Photodrugs based on marine Progesterone Antagonists“

Ch. Orth, D. Oehler, W.S.L. Strauß, A.S.K. Hashmi, M. Schubert-Zsilavecz

13th International Congress on Photobiology in San Francisco

„Nonsteroidale Antiprogestins as a basis for the Development of new Photodrugs“

D. Oehler, Ch.Orth, W.S.L. Strauß, A.S.K. Hashmi, M. Schubert-Zsilavecz

EUFEPS 2000 - the 6th European Congress of Pharmaceutical Sciences in Budapest

„Development of new PDT-Drugs based on nonsteroidal Antiprogestine of marine origin“

Ch. Orth, D. Oehler, W.S.L. Strauß, A.S.K. Hashmi, M. Schubert-Zsilavecz

Third European Graduate Student Meeting in Frankfurt/Main

Vorträge

Vorstellung des Dissertationsthemas im Rahmen des Arbeitsgruppenseminars am
25.9.1998 in Coligo, Italien

Vorstellung des Dissertationsthemas im Rahmen des Graduiertenkollegs am
9.1.1999 im Hotel Erbismühle/Taunus

„Synthese von steroidrezeptor-bindende Phototherapeutika“

im Rahmen des Arbeitsgruppenseminars am 11.9.1999 in Ritzlern, Österreich

Vorstellung von Forschungsergebnisse im Rahmen des Graduiertenkollegs am
9.1.2000 im Hotel Erbismühle/Taunus

„Neue Wirkstoffe und Indikationen in der Photodynamischen Therapie“

im Rahmen des Arbeitsgruppenseminars am 5.9.2000 in Poderndorf, Österreich

„Nichtsteroidale Antiprogesterine als Basis für neue PDT-Wirkstoffe“

Vorstellung von Forschungsergebnisse im Rahmen des Graduiertenkollegs am

13.1.2001 im Waldhotel Geitz in Geisenheim